

Βιολογία του Νευροενδοκρινικού συστήματος και των GEP-NETs

Περιεχόμενα

Η βιολογία του Νευροενδοκρινικού συστήματος και των GEP-NETs	1
Νευροενδοκρινικό σύστημα.....	2
Βιολογία	5
Εμβρυική προέλευση των NE κυττάρων	5
Μορφολογία και λειτουργία των NE κυττάρων	13
Πολλαπλασιασμός των NE κυττάρων.....	26
Νευροενδοκρινείς όγκοι: αιτιολογία και παθογένεια	28
Η νεοπλασματική μεταμόρφωση στα GEP-NETs.....	32
Μοριακά γεγονότα στα pNETs.....	33
Μοριακά γεγονότα στα si-NETs	36
Μοριακά γεγονότα στα Neuroendocrine Carcinomas	39
Μεταστάσεις.....	43
Το μεταγραφικό προφίλ των GEP-NETs (Transcriptional Profiling).....	43
Η επιγενετική των GEP-NETs.....	44
Επιγενετικοί μηχανισμοί.....	44
Η τρέχουσα θέση της επιγενετικής στα NETs	46
MicroRNAs στα NETs	47
lncRNA στα NETs	47
Κλινική χρησιμότητα.....	48
Συμπέρασμα	51
Βιβλιογραφία	60

Η βιολογία του Νευροενδοκρινικού συστήματος και των GEP-NETs

Είναι συνήθως δύσκολο σε ένα βιβλίο χειρουργικής να περιγράφονται βασικές έννοιες βιολογίας και φυσιολογίας. Όμως η κατανόηση του νευροενδοκρινικού συστήματος (ΝΕΣ) είναι βασική για όλα αυτά που θα διαβάσει ο αναγνώστης στην συνέχεια. Εδώ θα προσπαθήσουμε όσο πιο απλοϊκά μπορούμε να δώσουμε αυτές τις έννοιες ώστε ο απλός γιατρός και χειρουργός να

μπορέσει να καταλάβει ακόμα πιο καλά τους νευροενδοκρινείς όγκους (NETs, NENs) ¹. Τα NENs, στις επόμενες δεκαετίες νομίζουμε ότι θα είναι μεγάλο τμήμα της χειρουργικής ογκολογίας και ειδικά της χειρουργικής Ήπατος Παγκρέατος Χοληφόρων, μια και είναι συνήθως όγκοι που ανακαλύπτονται σε προχωρημένα στάδια με μεταστάσεις κυρίως στο ήπαρ. Όμως πρέπει να θυμίσουμε ότι στα NENs, ότι παρόλη την πρόοδο στην διάγνωση και θεραπεία των όγκων αυτών τα τελευταία 20 χρόνια, πολλά πράγματα είναι δυσνόητα και πολύπλοκα πολλές φορές, και ούτε και το κύτταρο προέλευσης των όγκων αυτών ούτε η βιολογική βάση των GEP-NENs είναι απόλυτα κατανοητά μέχρι σήμερα ¹.

Νευροενδοκρινικό σύστημα

Το Νευροενδοκρινικό σύστημα (ΝΕΣ) σύμφωνα με τον ορισμό του, αποτελείται από κύτταρα που μοιάζουν με νευρώνες, αδένες και μη ενδοκρινικούς ιστούς, και παράγει και προσλαμβάνει νευροχημικές ενώσεις, ορμόνες και μόρια σηματοδότησης, που συνεργάζονται με αρμονικό τρόπο και ολοκληρωμένο τρόπο για τη συλλογική ρύθμιση μιας φυσιολογικής κατάστασης ή συμπεριφοράς ². Πρακτικά και με απλά λόγια το ΝΕΣ είναι οι μηχανισμοί και συστήματα με τα οποία επικοινωνεί το νευρικό με το ενδοκρινικό σύστημα (κυρίως) αλλά και με τα υπόλοιπα συστήματα. Ένα παράδειγμα τέτοιου συνδυασμού γνωστό σε όλους μας, είναι ο άξονας του υποθάλαμου-υπόφυσης, που συνδέει το νευρικό σύστημα με το ενδοκρινές σύστημα μέσω της υπόφυσης, έτσι η βαζοπρεσίνη και η οξυτοκίνη, που παράγονται στα ΝΕ κύτταρα του οπισθίου λοβού της υπόφυσης, απελευθερώνονται στα αιμοφόρα τριχοειδή και έτσι στην γενική κυκλοφορία ³.

Το νευροενδοκρινικό σύστημα λοιπόν αποτελείται από ειδικά κύτταρα που ονομάζονται νευροενδοκρινή κύτταρα (ΝΕ). Προέρχονται από νευροενδοκρινή βλαστικά κύτταρα, τα οποία κατανέμονται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης σε όλη την νευρική ακρολοφία, τους ενδοκρινείς αδένες και το διάχυτο ενδοκρινικό σύστημα ⁴. Κατανέμονται σε όλο το σώμα και είναι τροποποιημένα νευρικά κύτταρα (νευρώνες χωρίς συνάψεις) που παράγουν επίσης και ορμόνες και άλλες ουσίες όπως τα κύτταρα του ενδοκρινικού συστήματος. Λαμβάνουν μηνύματα (σήματα) από το νευρικό σύστημα και ανταποκρίνονται με παραγωγή και απελευθέρωση ορμονών. Αυτές οι ορμόνες ελέγχουν πολλές λειτουργίες του σώματος. Το ποσοστό των ΝΕ κυττάρων στο σώμα μας εκτιμάται σε ~ 1% ⁵ και αντικατοπτρίζει το ποσοστό των καρκίνων με νευροενδοκρινικά στοιχεία (1%) ^{6,7}.

Το Νευροενδοκρινές Σύστημα (ΝΕΣ) λοιπόν, αποτελείται από το αδενικό σύστημα (συμπαγές) και το διάχυτο σύστημα (DNES) ¹. Εμβρυολογικά, αυτά τα συστήματα είναι διαφορετικά, διότι το συμπαγές προέρχεται από το εξώδερμα, και το διάχυτο από το ενδόδερμα ^{1,8}. Τα κύτταρα αυτά του ΝΕΣ είναι ομοιάζοντα με νευρικά και επιθηλιακά κύτταρα. Τα επιθηλιακά ΝΕ κύτταρα βρίσκονται στα συμπαγή όργανα, το δέρμα και τις βλεννογονικές μεμβράνες ⁹.

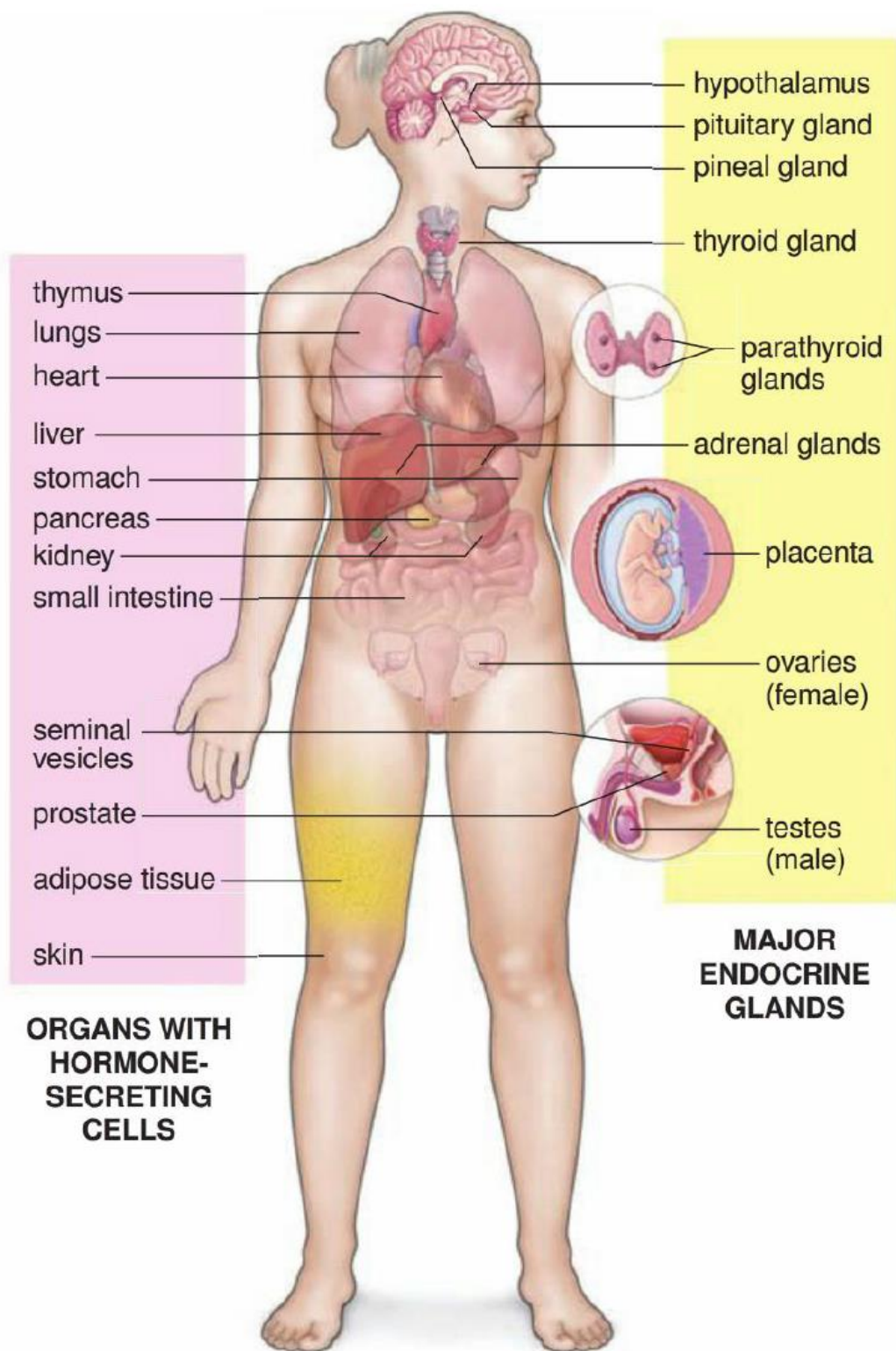
Το **συμπαγές** αδενικό σύστημα αποτελείται από ΝΕ κύτταρα (επιθηλιακά και νευρικά) που σχεδόν εξ ολοκλήρου σχηματίζουν (Εικ. 15):

1. την υπόφυση,
2. τους παραθυρεοειδείς,
3. τα παραγάγγλια και
4. το μυελό των επινεφριδίων,

¹ NETs = NENs. Οι όροι αυτοί θα χρησιμοποιούνται αδιακρίτως στο βιβλίο αυτό μια και γίνεται προσπάθεια παγκοσμίως να μετονομασθούν, τα NETs σε NENs, που είναι πιο σύγχρονος όρος σύμφωνα με τις οδηγίες της ENETS.

Το **διάχυτο σύστημα** αποτελείται από επιθηλιακά ΝΕ κύτταρα και ανευρίσκονται εξ ορισμού σχεδόν σε κάθε όργανο του σώματος μας. Τα ΝΕ κύτταρα αυτά ανευρίσκονται διάσπαρτα κυρίως στον γαστρεντερικό σωλήνα (λεπτό και παχύ έντερο, ορθό, στομάχι και 12/λο, τον οισοφάγο και την σκωληκοειδή απόφυση), και το πάγκρεας (νησιδιακά κύτταρα και όχι μόνον), τον πνεύμονα και τους βρόγχους, τον θύμο αδένα, στην ανώτερη αναπνευστική οδό της κεφαλής και του τραχήλου, και σπανιότερα στο ήπαρ και το χοληφόρο δένδρο, το ουροποιογεννητικό σύστημα, τον τράχηλο κυρίως αλλά και την μήτρα, τις ωοθήκες και τους όρχεις, το δέρμα, τον θυροειδή αδένα (C κύτταρα) και πρακτικά σε κάθε όργανο ¹⁰ (Εικ. 15).

Τα νευρικά κύτταρα του ΝΕ συστήματος σπάνια υφίστανται υπερπλασία ή/και νεοπλασματικούς μετασχηματισμούς. Αντίθετα, τα επιθηλιακά κύτταρα του ΝΕ συστήματος όπως αυτά των ενδοκρινών αδένων και αυτά των βλεννογόνων και του δέρματος μπορούν πολύ πιο εύκολα να σχηματίσουν νευροενδοκρινείς όγκους (NETs). Ο χαρακτηρισμός ενός όγκου ως NET απαιτεί την χρήση ανοσοϊστοχημείας και όχι απλής μορφολογικής εξέτασης στην παθολογοανατομική εξέταση ¹¹⁻¹³.



Εικόνα 15: Εντόπιση των μεγάλων ενδοκρινών αδένων (δεξιά) και των οργάνων με κύτταρα που εκκρίνουν ορμόνες (ως τμήμα του DNES) για να ρυθμίζουν την δραστηριότητά τους. Επιπλέον, ο λιπώδης ιστός είναι ένα σημαντικός ορμονικά ενεργός ιστός που εκκρίνει μια ποικιλία από ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες, ονομάζονται λιποκίνες (adipokines). Από ¹⁴.

Βιολογία

Τα νευροενδοκρινή κύτταρα αυτά έχουν μορφολογικές και φυσιολογικές συνιστώσες και από τα δυο ρυθμιστικά συστήματα, το νευρικό και το ενδοκρινές ¹⁵. Ο όρος “νευροενδοκρινή κύτταρα” σημαίνει τον τύπο των κυττάρων που συνθέτουν ορμόνες στο κυτταρόπλασμα τις αποθηκεύουν σε πυκνά κοκκία (dense core granules, DCGs) ¹⁶ και τις μεταφέρουν στην κυτταρική τους μεμβράνη και τελικά τις εκκρίνουν στο αίμα ¹⁷. Τα DCGs αυτών των κυττάρων είναι παρόμοια με τα DCGs των σεροτονινεργικών νευρώνων που αποθηκεύουν μονοαμίνες, όμως τα NE κύτταρα δεν έχουν συνάψεις. Ο όρος “νεύρο” ταιριάζει λόγω των DCGs, και ο όρος ενδοκρινές ταιριάζει λόγω της σύνθεσης, αποθήκευσης και έκκρισης αυτών των μονοαμινών (πεπτιδικές ορμόνες) ¹¹. Πολλές, από τις ουσίες αυτές, μπορεί επίσης να λειτουργήσουν ως νευροδιαβιβαστές. Η μετάδοση ενός τέτοιου σήματος μοιάζει με την νευρωνική σηματοδότηση. Η διαφορά μεταξύ νευροδιαβίβασης και ενδοκρινικής διαβίβασης βασίζεται στην εγγύτητα μεταξύ του χώρου της έναρξης της διαβίβασης και του κυττάρου προορισμού. Οι νευρώνες απελευθερώνουν το προϊόν τους στη σύναψη όπου αυτό ταξιδεύει σε ένα διπλανό κύτταρο, τα νευροενδοκρινικά κύτταρα απελευθερώνουν συνήθως τα προϊόντα τους στην κυκλοφορία του αίματος, ενώ ο στόχος μπορεί να είναι μακρινός σε άλλα μέρη του σώματος, όπως στην κλασική Ενδοκρινολογία, ή σε κοντινή απόσταση, ένα φαινόμενο που έγινε γνωστό ως παρακρινής σηματοδότηση. Μια τέτοια πολύ γνωστή ουσία που φαίνεται να ενεργεί ως παρακρινής ορμόνη εντός του γαστρεντερικού σωλήνα και του παγκρέατος είναι η σωματοστατίνη, η οποία αναστέλλει άλλα γαστρεντερικά και παγκρεατικών νησιδιακά κύτταρα.

Ο φαινότυπος των NE κυττάρων δεν συνδέεται με την ιστογένεση τους ούτε φυσικά με τις ορμόνες που παράγονται σε κάθε περίπτωση. Έτσι τα NE κύτταρα του λάρυγγα, του πνεύμονα, του θυμού και του θυροειδούς αδένος, έχουν διαφοροποιηθεί προς την πλευρά του νευρώνα (neural-like), ενώ άλλα NE κύτταρα όπως του γαστροεντεροπαγκρεατικού συστήματος (GEP), έχουν διαφοροποιηθεί προς επιθηλιακά κύτταρα (epithelial like) ⁸, ενώ φαίνεται ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των νευροενδοκρινικών κυττάρων και των νευρικών απολήξεων των NE κυττάρων που προέρχονται από την νευρική ακρολοφία ¹⁸.

Τα περισσότερα από αυτά τα NE κύτταρα δεν ομαδοποιούνται ως συμπλέγματα σε κανένα συγκεκριμένο μέρος του ΓΕΣ, αλλά αντίθετα μάλλον, τα NE κύτταρα κατανέμονται μεμονωμένα σε όλο το γαστρεντερικό επιθήλιο. Για το λόγο αυτό, χαρακτηρίζονται ως αποτελούντα μέρος του διάχυτου νευροενδοκρινικού συστήματος (DNES). Μια αξιοσημείωτη εξαίρεση σε αυτό το μοτίβο κατανομής βρίσκεται στο πάγκρεας. Εδώ, τα NE κύτταρα, που προέρχονται επίσης από το εμβρυϊκό foregut, αποτελούν εξειδικευμένες συσσωρεύσεις που ονομάζονται νησίδια του Langerhans αλλά υπάρχουν και μεμονωμένα στους αδένες των παγκρεατικών πόρων (pancreatic duct glands, PDGs) αλλά και αλλού.

Εμβρυϊκή προέλευση των NE κυττάρων

Η προέλευση των NE κυττάρων και κατά συνέπεια και των NE κυττάρων των NENs δεν είναι καλά κατανοητή ^{1, 8}. Τα κύτταρα αυτά έχουν αποτελέσει αντικείμενο εντατικής μελέτης και διαφωνιών για πολλά χρόνια, και εδώ και δεκαετίες διαρκεί η συζήτηση για την εμβρυολογική προέλευση των νευροενδοκρινικών κυττάρων ^{1, 19-21} με διάφορους μελετητές να υποστηρίζουν τόσο την ενδοδερματική προέλευση τους (κυρίως σήμερα) ^{19, 22, 23}, όσο και την από την εξωδερματική προέλευση από την νευρική ακρολοφία (neural crest) των νευροενδοκρινικών κυττάρων ²³⁻³¹.

Στο παρελθόν θεωρούταν ότι τα NE κύτταρα μετανάστευαν από την αρχέγονη νευρική ακρολοφία (neural crest) στις ανατομικές τους θέσεις τους στον ενήλικα ³² (Εικ. 16). Μια σημαντική έννοια ήταν η ικανότητά τους να προσλαμβάνουν αμίνες για την σύνθεση πεπτιδίων, ένα

χαρακτηριστικό που έδωσε αφορμή για την ορολογία «amine precursor uptake and decarboxylation» (APUD) για αυτό το σύστημα^{33, 34}. Η προέλευση αυτών των κυττάρων από το νευροεξώδερμα (λανθασμένα) ήταν θεμελιώδης αρχή αυτής της θεωρίας, που οδήγησε σε πολλές αντιπαραθέσεις, παρά την ελάχιστη σημασία αυτής της πτυχής της θεωρίας. Αυτά τα κύτταρα γενικά βρίσκονται επίσης όχι μόνο στον αδένα τον οποίον αποτελούν, αλλά και σε όλο το σώμα, υποστηρίζοντας την έννοια του DNES και θεωρούνταν ότι προέρχονται εμβρυολογικά από την νευρική ακρολοφία³⁵. Έτσι ιστορικά τα NENs που προέρχονται από αυτά τα NE κύτταρα έχουν περιγραφεί με όρους όπως καρκινοειδές, αργενταφίνωμα, APUDoma, μικροκυτταρικό καρκίνωμα, όγκοι νησιδιακών κυττάρων, μυελοειδές καρκίνωμα θυρεοειδούς, όγκος κυττάρων Merkel, νευροενδοκρινικός όγκος (NET) και νευροενδοκρινικό καρκίνωμα (NEC) κ.

Αυτή η έννοια APUD κύτταρων, σχετικά έξυπνα, εξηγεί την προέλευση των συνδρόμων MEN που παράγουν πολλαπλές πεπτιδικές ορμόνες, από σύγχρονους ή/και μετάχρονους όγκους που εμφανίζονται σε πολλαπλά όργανα. Ενώ η υπόφυση και τα επινεφρίδια, τα κυρίαρχα όργανα που πάσχουν στα MEN, είναι γνωστό ότι προέρχονται από το εξώδερμα, το πάγκρεας όμως προέρχεται από το ενδόδερμα. Έτσι η έννοια του APUD cell υπερνικά αυτή την εμβρυϊκή παραδοξότητα. Παρόλα αυτά όμως σήμερα πιστεύουμε ότι τα NE κύτταρα του παγκρέατος δεν προέρχονται από την νευρική ακρολοφία αλλά από το ενδόδερμα, που σημαίνει ότι τα κύτταρα αυτά πρέπει να προέρχονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του παγκρέατος όπως π.χ., τα επιθηλιακά κύτταρα των παγκρεατικών πόρων ή τα PDGs, η από το κεντρικό λεπτό έντερο που είναι πολύ κοντά στο πάγκρεας εμβρυολογικά. Ιστολογικά τα pNENs φαίνεται ότι προέρχονται από το πάγκρεας ή από ιστούς πολύ κοντά σε αυτό¹⁹. Συνεπώς θεωρητικά τα pNENs θα μπορούσαν να προέρχονται από τα κύτταρα των νησιδίων (Langerhans islets), και από εδώ προέρχεται και η παλιά τους ονομασία νησιδιακοί όγκοι του παγκρέατος (islet cell tumors).

Όμως σύμφωνα με παλιότερες θεωρίες, υπάρχουν και άλλες πιθανές περιοχές εντός του παγκρέατος και των ανατομικά και εμβρυολογικά συγγενών με το πάγκρεας ιστών από όπου τα κύτταρα αυτά μπορεί να προέρχονται όπως π.χ., και σε αντίθεση με τα ώριμα NE κύτταρα του παγκρέατος, υπάρχουν και πολυδύναμα αρχέγονα κύτταρα που μπορεί να διαφοροποιηθούν σε ώριμα NE κύτταρα ή και σε κακοήγη κύτταρα όπως τα αδenoκαρκινώματα ή τα καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων τα οποία έχουν την δυνατότητα trans-διαφοροποίησης σε NE κύτταρα. Επιπλέον, τα ενδοπορικά θηλώδη βλεννώδη νεοπλάσματα (IPMNs) θεωρείται ότι επίσης μπορεί να έχουν ένα κοινό νεοπλασματικό προγονικό κύτταρο με τα pNENs ή μπορούν να trans-διαφοροποιηθούν σε pNENs³⁶⁻³⁸. Μια άλλη υπόθεση (από τις αρκετές) προτείνει ότι ανάπτυξη ή η νεογένεση των νησιδίων του παγκρέατος (και κατά συνέπεια των pNENs) μπορεί να προέρχεται από ένα προγονικό νησιδιακό κύτταρο που προέρχεται από ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα του παγκρέατος, όπως π.χ., ένα κυψελοειδές κύτταρο (acinar cell) μετά από trans διαφοροποίηση³⁹. Ακόμα απομονωμένα NE κύτταρα υπάρχουν κοντά στα κυψελοειδή (acinar) κύτταρα του παγκρέατος και μπορεί επίσης να είναι η προέλευση αυτών των όγκων⁴⁰⁻⁴². Τέλος, όταν εξετάζει κανείς την προέλευση των pNENs, η έννοια του APUD cell είναι ακόμα σχετικά λογική αλλά υπάρχουν και άλλα στοιχεία που να υποστηρίζουν την προέλευση αυτών των κυττάρων από το ενδόδερμα ή/και από trans-διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων του παγκρέατος^{39, 43}.

Πρόσφατες μελέτες του γαστρικού και εντερικού επιθηλίου ανέδειξαν ότι τα νευροενδοκρινικά κύτταρα είναι απόγονοι πολυδυνάμων βλαστοκυττάρων^{1, 44-48}. Ως εκ τούτου, φαίνεται πιθανό ότι τα γαστρεντερικά νευροενδοκρινικά κύτταρα προέρχονται από τοπικά ειδικά των ιστών βλαστικά κύτταρα, πιθανώς μέσω ενός προορισμένου για αυτό προγονικού κυττάρου. Στο πάγκρεας, πιστεύεται ότι το κοινό προγονικό κύτταρο είναι εντός του πορογενούς επιθηλίου

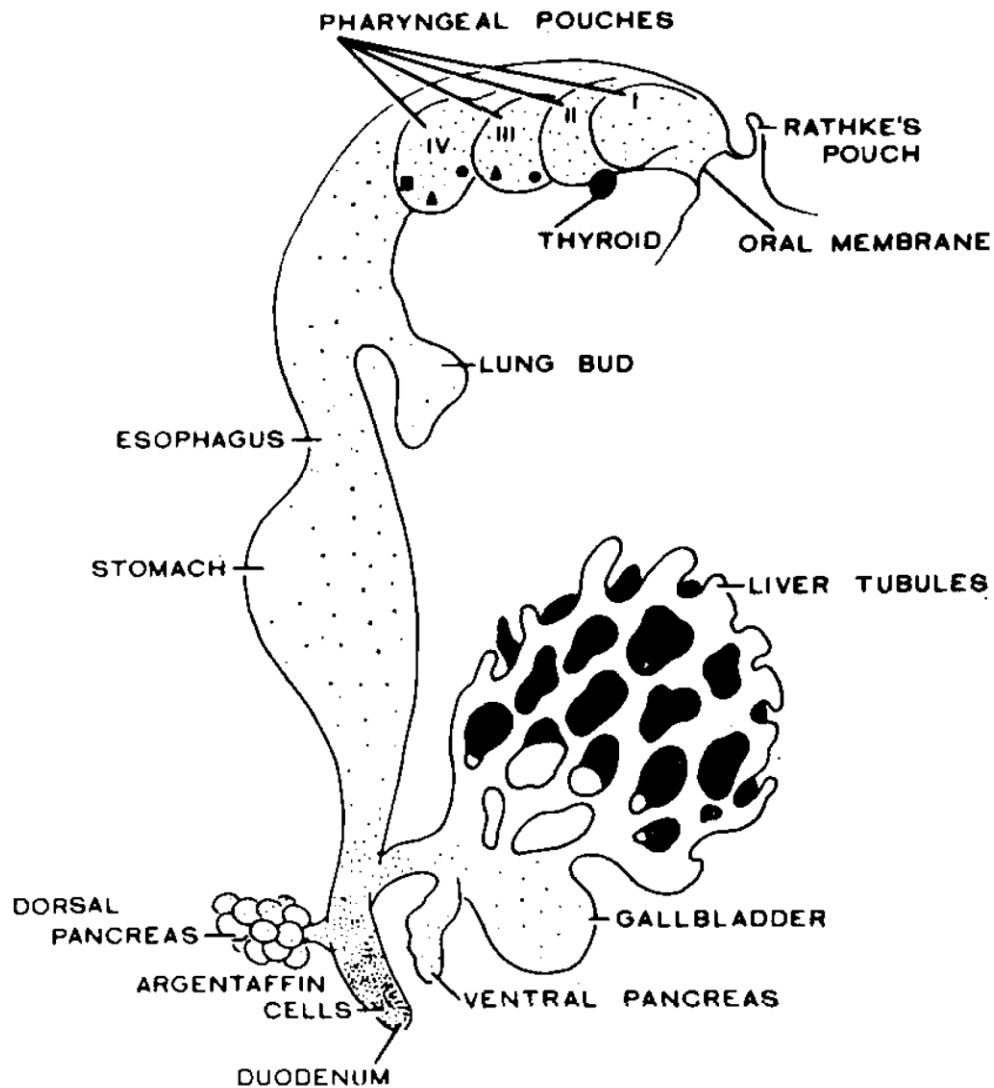
(επιθήλιο των παγκρεατικών πόρων κυρίως), και αυτή η δομή παρέχει και την βάση για τη γένεση των παγκρεατικών νησιδίων⁴⁹⁻⁵¹ (Εικ. 16-19).

Αυτή τη στιγμή η πιο αποδεκτή πρόταση καταγωγής όλων αυτών των NE κυττάρων, όπως εδώ του ΓΕΣ, δίνεται από την «Unitarian Theory» (Μοντεριανή ή ενωτική θεωρία) της εντερικής κυτταρογένεσης, η οποία θεωρεί ότι οι γαστρεντερικές κυτταρικές σειρές προέρχονται από τοπικά κοινά πρόδρομα πολυδύναμα (εκκριτικά) βλαστικά κύτταρα, που βρίσκονται στη βάση των κρυπτών του βλεννογόνου του εντέρου ή στην περιοχή του λαιμού των γαστρικών αδένων του γαστρικού βλεννογόνου^{1, 52} (Εικ. 20). Ο ακριβής μηχανισμός της διαφοροποίησης των NE κυττάρων του DNES είναι ακόμα ανεπαρκώς κατανοητός αν και επιμέρους μεταγραφικοί παράγοντες έχουν ανευρεθεί όπως οι *math1*, *neurogenin-3* (*NGN3*) και *neuroD/Beta2*⁵³ κ.α. (Εικ. 17). Στην ανάπτυξη των pNENs έχουν περιγράψει άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι *CDX2*, *Nkx2.2*, *Nkx6.1*, *Pax6*, και *Is11* που εμπλέκονται στην ενδοκρινική διαφοροποίηση από τα πολυδύναμα κύτταρα του παγκρέατος (από τα νησίδια του Langerhans, τους παγκρεατικούς πόρους και αδένες αυτού)^{23, 54}. Πιθανόν τα διάφορα αυτά ρυθμιστικά γονίδια έχουν ένα κοινό μηχανισμό που να δουλεύει και στα νευρικά αλλά και σε NE κύτταρα ανεξαρτήτως αν η προέλευση τους είναι ενδοδερματική ή εξωδερματική²⁶. Επίσης η σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ του επιθηλιακών κυττάρων και του μεσεγχυματικού στρώματος στα NENs έχει αναδειχθεί από τους Dumortier et al.⁵⁵ με μια πιθανή επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) στα GEP-NENs, όμως οι συνέπειες αυτής της μετάβασης δεν έχουν ακόμα καλά κατανοηθεί στην ογκογένεση των NENs²⁶.

Σε γενικές γραμμές, τα NE κύτταρα είναι σε τελικό στάδιο διαφοροποίησης και θεωρούνται ως μη έχοντα την δυνατότητα περαιτέρω πολλαπλασιασμού όπως αποδεικνύεται από την απουσία δεικτών πολλαπλασιασμού, όπως το Ki67, σε κύτταρα που εκφράζουν CgA⁵⁶.

Όμως ένας εναλλακτικός μηχανισμός πολλαπλασιασμού πιθανότατα υπάρχει επειδή τα NE κύτταρα είναι σε θέση να προσαρμοστούν με πολλαπλασιασμό σε παθολογικά και φυσιολογικά ερεθίσματα από το περιβάλλον τους⁵⁷. Αποδεικτικά στοιχεία για το φαινόμενο αυτό προέρχονται από τα γαστρικά ECL κύτταρα⁵⁸. Τα ECL κύτταρα, βρίσκονται στο οξυντικό βλεννογόνο του στομάχου και αλληλοεπιδρούν με τα γαστρικά G-κύτταρα του άντρου, τα οποία εκκρίνουν γαστρίνη και ενεργοποιούν την παραγωγή ισταμίνης από ECL-κύτταρα, η οποία, με τη σειρά της, οδηγεί την έκκρισης οξέος από τα τοιχωματικά (parietal) κύτταρα του στομάχου. Απώλεια των τοιχωματικών κυττάρων (π.χ. σε ατροφική γαστρίτιδα) ή η καταστολή της παραγωγής οξέος (φαρμακευτικά, PPIs κλπ.) οδηγεί σε αυξημένο pH του στομάχου και αυξημένη έκκριση γαστρίνης που κορυφούται με έντονη ECL κυτταρική υπερπλασία (για αύξηση της παραγωγής ισταμίνης) και ακόμη και σε νεοπλασία. Εάν τα κύτταρα ECL είναι σε τελικό στάδιο διαφοροποίησης, αυτό υποδηλώνει ότι ο μηχανισμός του πολλαπλασιασμού των, υπάρχει ήδη εντός των βλαστικών κυττάρων ECL ή στον πρόγονο τους. Δεδομένου ότι ένα παρόμοιο φαινόμενο παρουσιάζεται ως ένα στοιχείο στην υπεργαστριναιμία του MEN1 συνδρόμου, με πιθανό επακόλουθο τα γαστρικά καρκινοειδή σε σύνδρομο MEN1, είναι πιθανό ότι μια εγγενής γενετική εκδήλωση της γαστρίνης ίσως να ενεργοποιείται⁵⁹.

Ίσως ακόμα η ανάδειξη CSCs (cancer stem cells) όπως σε άλλους όγκους συμπαγών οργάνων έχει αναδειχθεί αλλά όχι ακόμα στα GEP-NENs μας βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των ρυθμιστικών μηχανισμών εκείνων που οδηγούν στην καρκινογένεση των NENs και έτσι συμβάλλει στην θεραπεία τους²⁶.



Εικόνα 16: Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομής των κυττάρων argentaffin του νευρικού συστήματος, του γαστρεντερικού σωλήνα και των οργάνων που προέρχονται από αυτά. Οι κουκκίδες αντιπροσωπεύουν τοποθεσίες όπου είχαν βρεθεί και αναφερθεί argentaffin κύτταρα μέχρι τότε. ● Parathyroid. ▲ Thymus. ■ Ultimobranchial body Από ⁶⁰.

Cells of Origin

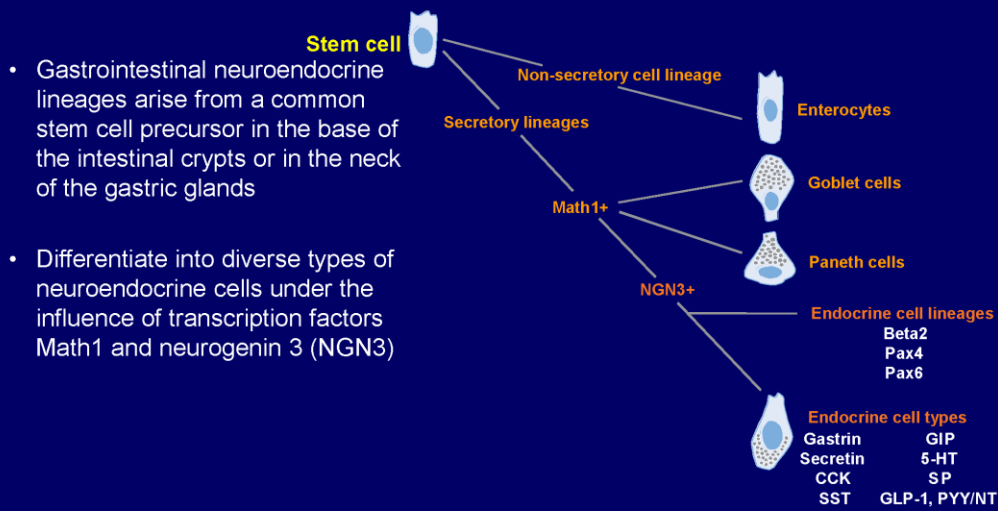
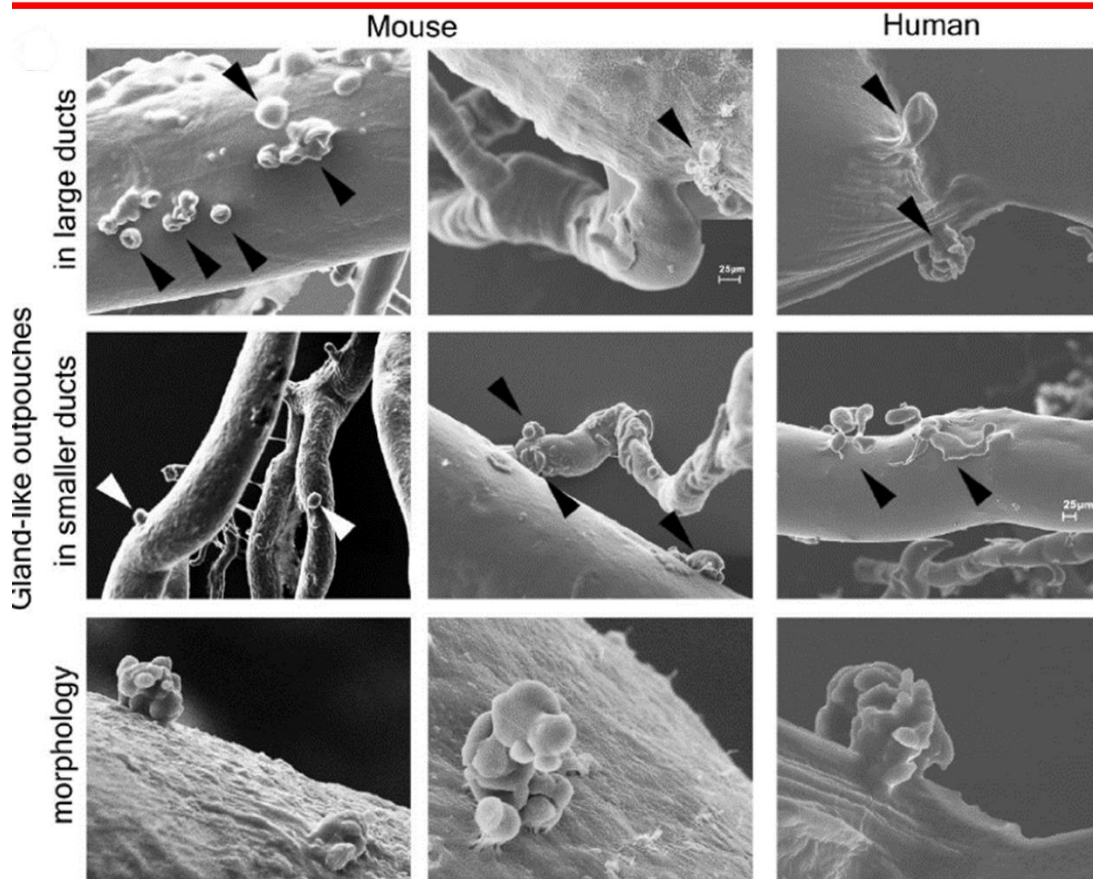
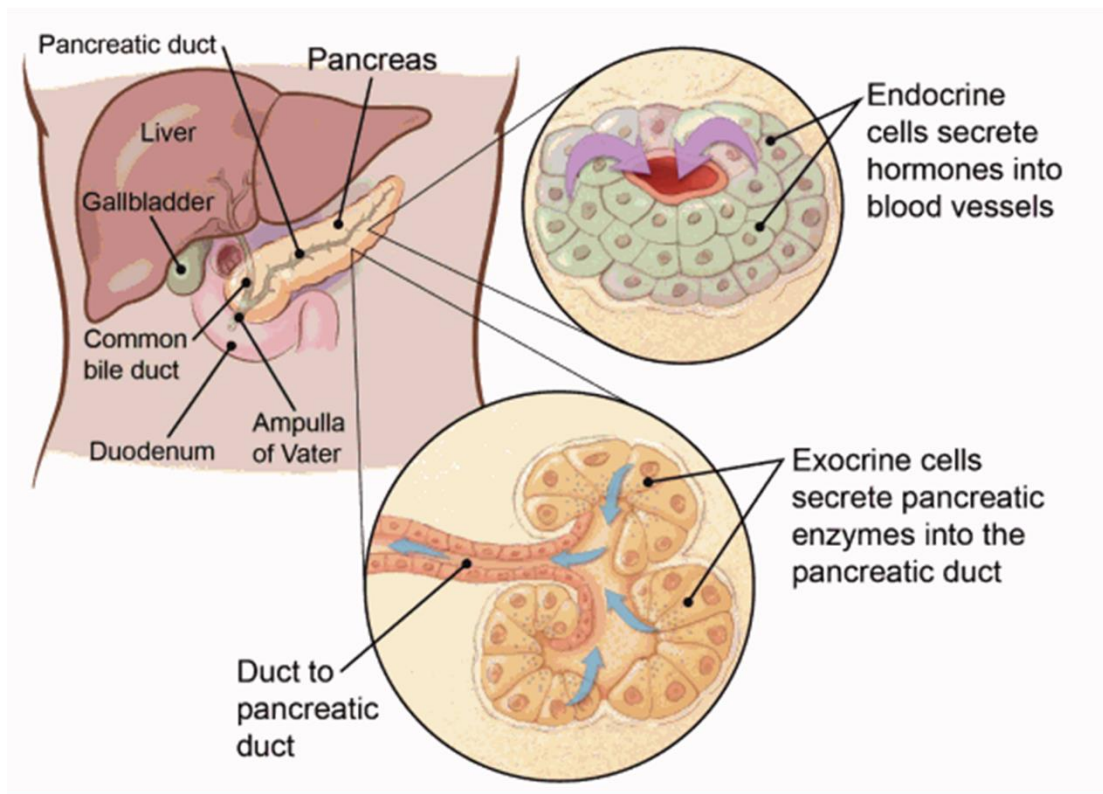


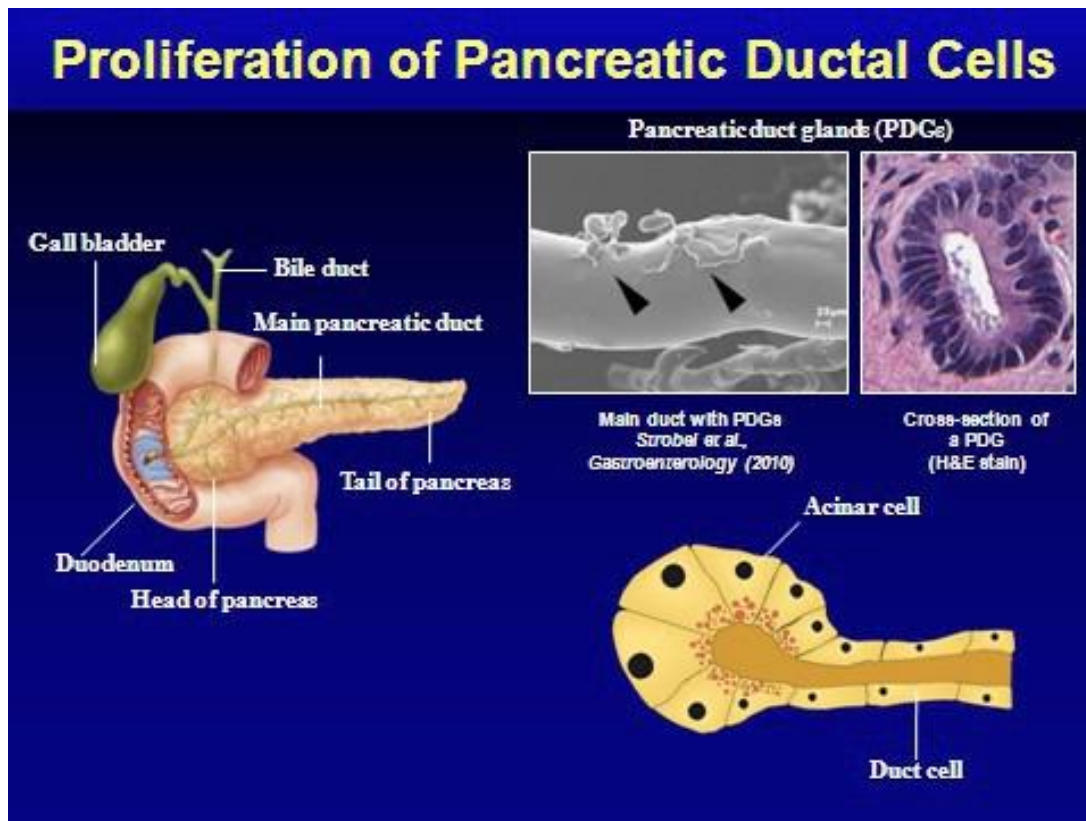
Image courtesy of IM Modlin.

Εικόνα 17: Η προέλευση των ΝΕ κυττάρων στον στόμαχο.

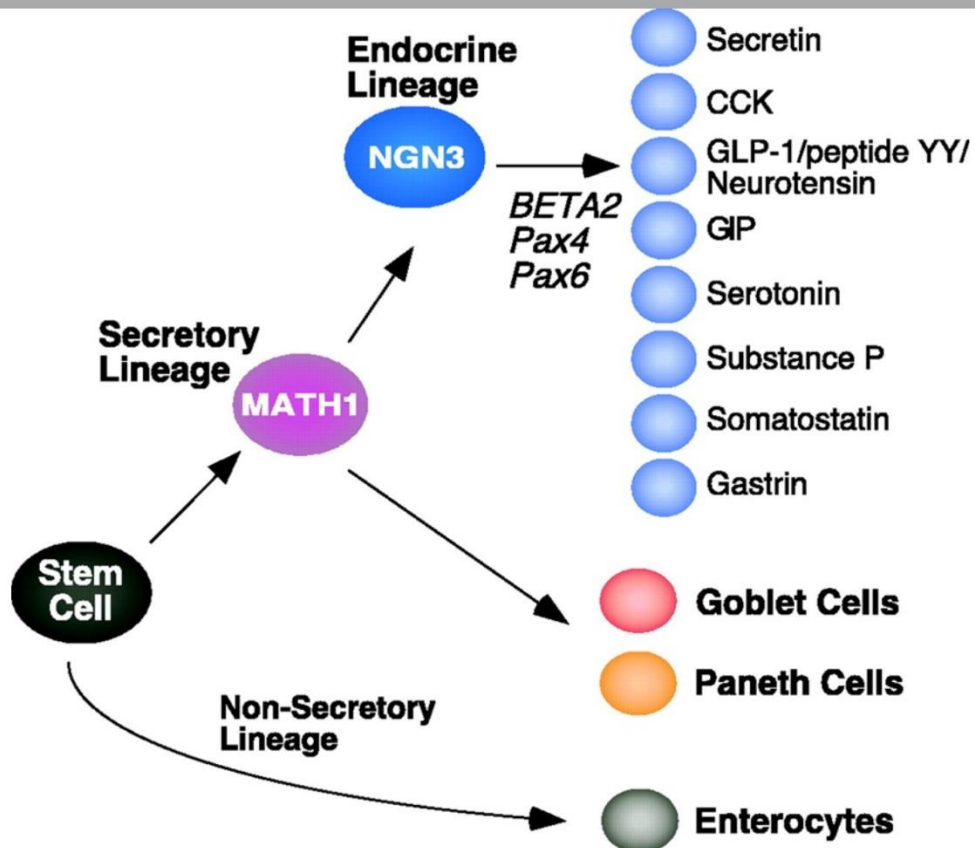
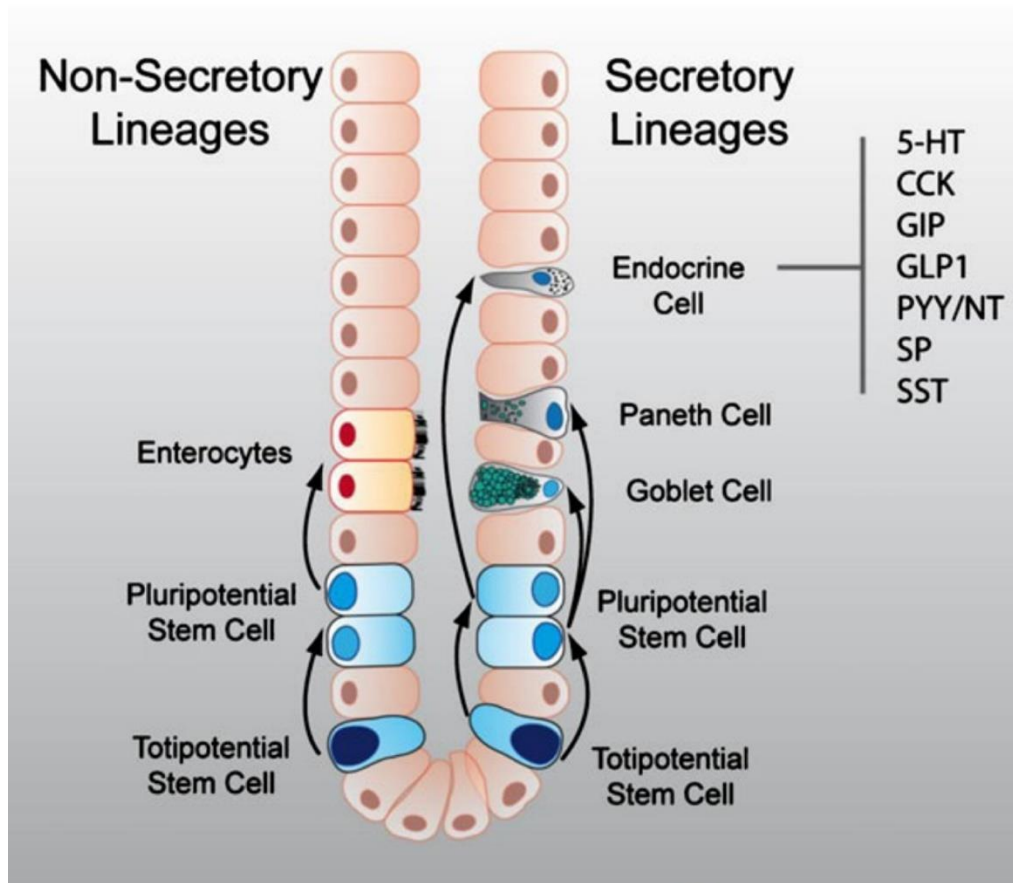


Εικόνα 18: Στο πάγκρεας, τα NE κύτταρα ανευρίσκονται στα νησίδια του Langerhans είτε στους παγκρεατικούς πόρους (άνω εικόνα). Έτσι για το πάγκρεας (σχηματικά και από εμβρυολογικής πλευράς), την θέση των γαστρικών αδένων παίρνουν τα κύτταρα των εκφορητικών πόρων των αδένων των παγκρεατικών πόρων (pancreatic duct glands, PDGs) (κάτω εικόνα). Εδώ, εκμαγεία των

παγκρεατικών πόρων του παγκρέατος, αποκαλύπτουν ότι οι παγκρεατικοί πόροι έχουν τυφλά εκκολπώματα (out pouches) που παριστούν τους αδένες των παγκρεατικών πόρων (PDGs)(εικόνες από SEM). Σύμφωνα με αυτά, από τα NE κύτταρα των πόρων των PDGs, φαίνεται να προέρχονται τα pNENs. Από ⁶¹.



Εικόνα 19: Το σύστημα των αδένων/πόροι του παγκρέατος περιέχει πρώτο- διαφοροποιημένα βλαστικά κύτταρα ικανά να διαφοροποιούνται σε μια ποικιλία ενδοκρινικών κυττάρων. Επιπλέον οι αδένες του παγκρεατικού πόρου (PDGs) μπορεί να αυξηθούν και να πολλαπλασιαστούν οδηγώντας στην ανάπτυξη ενός ενδοπορικού νεοπλάσματος του παγκρέατος (IPMN, PANINS) ή ενός pNEN, σχηματίζοντας έτσι την βάση των pNENs και NF-PNENS με διαφορετικά επίπεδα ιστολογικής βαθμονόμησης (διαβάθμισης) (Grading). Τροποποιημένη από ⁶²⁻⁶⁴.



Εικόνα 20: Σχηματική παράσταση της διαφοροποίησης των εντερικών κυττάρων στο ΓΕΣ (συμπεριλαμβανομένων των ΝΕ κυττάρων). Η διαφοροποίηση των ΝΕ κυττάρων του ΓΕΣ. Το αρχέγονο βλαστικά κύτταρα της κρύπτης των αδένων του βλεννογόνου (παντοδύναμα και

πολυδύναμα) δημιουργούν μια ποικιλία από τύπους κυττάρων του βλεννογόνου (totipotent και pluripotent stem cell): η Math1 expression⁶⁵ οδηγεί τα κύτταρα στην εκκριτική γραμμή και η NGN3⁶⁶ στην νευροενδοκρινή γραμμή. Η μεταγραφή ειδικών ορμονών ρυθμίζεται από αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως η Pax4, Pax6 και B2. Τελικά τα βλαστικά κύτταρα, διαφοροποιούνται σε όλους τους τέσσερις τύπους κυττάρων που υπάρχουν στο εντερικό επιθήλιο. Τροποποιημένη από^{1,53}.

Μορφολογία και λειτουργία των NE κυττάρων

Τα NE κύτταρα έχουν ένα νευρωνικό φαινότυπο που εκφράζει τις πρωτεΐνες NSE, συναπτοφυσίνη και χρωμογρανίνη Α (CgA), και πρωτεΐνες των νευρωνικών ινιδίων όπως η ιντερνεξίνη α (internexin α) και επιπλέον, εκφράζουν έναν φυσιολογικό «ορμονικό» φαινότυπο που κλασικά αποδίδεται στα ενδοκρινικά κύτταρα⁶⁷.

Δομικά τα NE κύτταρα μπορεί να είναι είτε “open” ή “closed” προς τον αυλό του εντέρου ή του αδένου ή του παγκρεατικού πόρου κλπ. (Εικ. 21). Τα περισσότερα εντερικά enterochromaffin (EC) και D (somatostatin) κύτταρα όπως επίσης και τα γαστρικά G (gastrin) κύτταρα είναι ανοικτού τύπου, με κορυφαίες κυτταροπλασματικές προεκτάσεις που εξέρχουν στον αδενικό ή βλεννογονικό αυλό με κοντές μικρολάνχνες που επιτρέπουν στα κύτταρα αυτά να “αισθάνονται” τις φυσικές ή χημικές τροποποιήσεις του περιεχομένου του αυλού⁶⁸ δηλαδή λειτουργούν ως «γευστικοί κάλυκες του εντέρου» και αντιπροσωπεύουν αισθητηριακούς μετατροπείς που ανταποκρίνονται σε μηχανικά ερεθίσματα και θεραπείες (Εικ. 21). Η νευρωνική συνιστώσα αντιπροσωπεύεται στη βάση των κυττάρων από συχνά εκτεταμένες κατά τον επιμήκη άξονα κυτταροπλασματικές προσεκβολές που καταλήγουν σε παρακείμενα γειτονικά κύτταρα⁶⁹. Οι προεκτάσεις αυτές μπορεί να φθάσουν και τα 50-80 nm σε μήκος, συχνά έχουν ένα άκρο που μοιάζει με νευρωνική σύναψη με το οποίο το NE κύτταρο αλληλοεπιδρά με τα παρακείμενα μη νευροενδοκρινικά κύτταρα⁷⁰ (Εικ. 22). Αυτές οι προσομοιάζουσες με δένδριτες, κυτταροπλασματικές προσεκβολές ενσαρκώνουν την νευρωνική συνιστώσα των NE κυττάρων και με αυτές, μόρια και ουσίες σηματοδότησης παραδίδονται στα γειτονικά νευρικά ινίδια στο χόριο του βλεννογόνου (lamina propria) ή στα παρακείμενα κύτταρα του βλεννογόνου και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος⁷¹ (Εικ. 23).

Κλειστά “closed” κύτταρα είναι η πλειοψηφία των NE κυττάρων του θόλου του στομάχου, τα ECL κύτταρα καθώς και τα γαστρικά D, EC, και X/A-like (ghrelin) κύτταρα. Τέτοια κύτταρα δεν έχουν πρόσβαση στον αυλό αλλά ρυθμίζονται από βασικά νευρικά και ορμονικά ερεθίσματα και σήματα. Όπως τα ανοικτά κύτταρα, εντούτοις, και αυτά επίσης έχουν μακριές αξονικές προσεκβολές, που ρυθμίζουν τη λειτουργία άλλων τύπων κυττάρων⁷².

Αν και αυτοί οι τύποι κυττάρων είναι παρόντες σε όλη τη γαστρεντερική οδό, σε ορισμένες περιπτώσεις, έχουν μια πιο περιορισμένη γεωγραφία (ανατομική θέση) από άλλα νευροενδοκρινικά κύτταρα (Εικ. 24). Σε κάθε όμως ανατομική περιοχή, τα NE κύτταρα ανευρίσκονται στον βλεννογόνο ή/και στον υποβλεννογόνο χιτώνα των οργάνων αυτών ή στους παγκρεατικούς πόρους για τα pNENs (Εικ. 17-19). Τα κύτταρα αυτά (enterochromaffin, EC cells, NE) είναι τα πιο άφθονα ενδοκρινικά κύτταρα στον γαστρεντερικό σωλήνα. Τα NE κύτταρα του ΓΕΣ εκπροσωπούν μόνο μια μικρή μειοψηφία (< 1%) του πληθυσμού όλων των επιθηλιακών κυττάρων του ΓΕΣ και των αδένων του, και συχνά είναι μακριά το ένα από το άλλο και αναμεσά τους υπάρχουν μη-ενδοκρινικά επιθηλιακά κύτταρα (Εικ. 20). Αυτά τα κύτταρα παράγουν και απελευθερώνουν τις πεπτιδικές ορμόνες τους και έτσι διαδραματίζουν βασικό ρόλο στον έλεγχο της έκκρισης και κινητικότητας του ΓΕΣ, στην ρύθμιση της πρόσληψης τροφής, στα επίπεδα μεταγευματικής γλυκόζης και μεταβολισμού⁷³. Όταν τα NE κύτταρα αλληλοεπιδρούν με το περιεχόμενο του αυλού του ΓΕΣ, απελευθερώνουν μόρια σηματοδότησης τα οποία μπορεί να

εισέλθουν στην κυκλοφορία και ενεργούν ως κλασικές ορμόνες σε μακρινούς στόχους. Δρουν επίσης τοπικά στα γειτονικά κύτταρα και σε ενδογενείς και εξωγενείς νευρωνικές οδούς και απολήξεις του εντέρου ⁵³.

Παρά τις διαφορές στην καταγωγή, όλα τα NE κύτταρα έχουν κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των νευροενδοκρινών κυττάρων είναι η παραγωγή στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, μιας μεγάλης ποικιλίας βιογενών αμινών, πεπτιδίων, ταχυκινών και προσταγλανδινών. Έχουν καλά ανεπτυγμένο αδρό (ακατέργαστο) ενδοπλασματικό δίκτυο (rER) για τη σύνθεση πεπτιδίων, μεγάλα συγκροτήματα Golgi για συσκευασία των ορμονικών προϊόντων τους, καθώς και πολυάριθμα εκκριτικών κοκκία για αποθήκευση και μεταφορά ορμονών στην επιφάνεια κυττάρων, για απελευθέρωση με εξωκύττωση (Εικ. 21). Τα εκκριτικά αυτά προϊόντα, μετά την συσκευασία τους στα σωματίδια Golgi, αποθηκεύονται τόσο σε μεγάλα, πυκνού πυρήνα κυστίδια του κυτταροπλάσματος (large dense core vesicles, LDCVs), όσο και σε μικρά κυστίδια όπως οι συνάψεις (synaptic-like microvesicles (SLMCVs) όπου αποθηκεύονται οι αμίνες. Τα εκκριτικά αυτά προϊόντα των NE κυττάρων που είναι πρωτεϊνικά παράγωγα μιας ποικιλίας γονιδίων, εκφράζονται σε διαφορετικές μορφές λόγω εναλλακτικής ωρίμανσης και διαφορική επεξεργασίας. Οι αποθηκευμένες ορμόνες και αμίνες απελευθερώνονται μέσω εξωκύττωσης στο αίμα, ή μερικές φορές προς τον αυλό του ΓΕΣ ^{74, 75} (Εικ. 21). Χαρακτηριστικοί ειδικοί κοκκώδεις δείκτες που σχετίζονται με τα LDCVs και SLMCVs είναι η χρωμογρανίνη και η συναπτοφυσίνη, αντίστοιχα. Όλα αυτά τα NE κύτταρα μπορούν να εκφράσουν NSE, συναπτοφυσίνη, σεκρετογρανίνες και χρωμογρανίνες (Εικ. 25α), καθώς και ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση και επεξεργασία των πεπτιδικών ορμονών. Αντισώματα είναι διαθέσιμα για πολλούς από αυτούς τους βιοδείκτες διαφοροποίησης των κυττάρων και σε ένα μεγάλο αριθμό για τους παράγοντες μεταγραφής και τις πεπτιδικές ορμόνες ⁷⁶ που καθορίζουν κάθε τύπο κυττάρου (Εικ. 25b-e).

Οι πρωτεΐνες στα εκκριτικά κοκκία σε σχεδόν όλα τα NE κύτταρα αποτελούνται κυρίως από την γλυκοπρωτεΐνη, χρωμογρανίνη Α, η οποία εκκρίνεται στο αίμα μαζί με ορμόνες και τις αμίνες. Άλλες κυρίαρχες πεπτιδικές ορμόνες που εκφράζουν και τα NE κύτταρα αλλά και τα NENs, και είναι γενικοί δείκτες νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης που είπαμε πιο πάνω εκτός της χρωμογρανίνης, η συναπτοφυσίνη και η ειδική των νευρώνων ενολάση (neuron-specific enolase, NSE). Αυτές είναι οι πεπτιδικές ορμόνες που χρησιμοποιούμε στην κλινική και μορφολογική διάγνωση των GEP-NENs, μια και είναι ανεξάρτητες από την ορμονική ή μη παραγωγή των κυττάρων ενός NET, και μοιράζονται ένα κοινό νευρικό-ενδοκρινικό φαινότυπο ⁷⁷.

Η χρωμογρανίνη Α (CgA) είναι μια πρωτεΐνη της μεμβράνης των εκκριτικών κοκκίων των NE κυττάρων και η συναπτοφυσίνη που είναι γνωστή και ως πρωτεΐνη p38 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης των νευρικών κυτταροπλασματικών προσυναπτικών κυστιδίων ⁴⁴ (Εικ. 26). Οι ουσίες αυτές (πεπτιδικές ορμόνες) είναι γενικοί βιοδείκτες στον ορό και στην ανοσοϊστοχημεία, και χρησιμοποιούνται ως καρκινικοί δείκτες των NENs ⁷⁸. Στα NE κύτταρα η CgA εκκρίνεται στον ορό όπως και στα NENs, όμως ο πραγματικός ρόλος της αύξησής της σε ασθενείς με NENs και η σχέση της με την αύξηση του όγκου δεν είναι γνωστός, αλλά εικαζόμενος. Όταν ένας NE όγκος αναπτύσσεται, τα επίπεδα της χρωμογρανίνης Α στο αίμα συνήθως είναι υψηλά, και έτσι η χρωμογρανίνη Α στο αίμα μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να παρακολουθήσουμε την πορεία της νόσου. Υπάρχει απόδειξη ότι η χρωμογρανίνη-Α ρυθμίζει την βιοσύνθεση του πυκνού πυρήνα των εκκριτικών κοκκίων ¹ (Εικ. 27, 28) και ότι η χρωμογρανίνη-Β ελέγχει την διαλογή και την συσκευασία των παραγομένων πεπτιδίων στα εκκριτικά κοκκία. Οι κόκκοι αυτοί εκκρίνονται στη συνέχεια υπό τον έλεγχο διαφόρων και πολυπλόκων ερεθισμάτων. Ο τύπος των εκκριτικών κοκκίων που παράγεται εξαρτάται εν μέρει από τον τύπο του κυττάρου. Μέχρι σήμερα, έχουν ανευρέθει

τουλάχιστον 17 διαφορετικοί τύποι ενδοκρινικών κυττάρων, με παραγωγή πάνω από 100 εκκριτικών προϊόντων ⁵³ όπως είπαμε και πιο πάνω και τονίζουμε ξανά εδώ για να καταλάβουμε την πολυπλοκότητα του συστήματος.

Η ενολάση είναι ένα γλυκολυτικό ένζυμο με 5 υποτύπους εκ των οποίων δυο εκφράζονται στα NE κύτταρα και την ονομάζουμε NSE. Αν τα NE κύτταρα των NENs έχουν NSE και καταστρέφονται από την γρήγορη αύξηση του όγκου ή από την θεραπεία του, τα επίπεδα της NSE αυξάνονται ⁷⁹. Τα μόρια προσκόλλησης των νευρικών κυττάρων (Neural cell adhesion molecules, NCAM) όπως το CD56 που συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων είναι επίσης ειδικοί δείκτες (Εικ. 26).

Η έκκριση των NE κυττάρων ρυθμίζεται με πολύπλοκους μηχανισμούς αλλά κυρίως από υποδοχείς συζευγμένους με G πρωτεΐνη όπως και με την δραστηριότητα της τυροσινικής κινάσης ¹⁴ όπως οι σωματοστατίνες (SSTRs) που είναι άλλο ένα κοινό σημείο των NE κυττάρων. Τα NE κύτταρα και τα NENs εκφράζουν τουλάχιστον δυο από τους πέντε υποτύπους των υποδοχέων σωματοστατίνης (SSTRs) που είναι απαραίτητοι για την ρύθμιση των ορμονών και αυτοί μπορεί να ανιχνευθούν είναι με λειτουργικές απεικονίσεις, είτε με ανοσοϊστοχημεία (IHC) στον παθολογοανατομικό παρασκεύασμα ⁸⁰ (Εικ. 29).

Δυο ισομορφές του ATP dependent vesicular monoamine transporter, οι VMAT1 και VMAT2, υπάρχουν και εμφανίζουν μια διαφορετική έκφραση στα LDCVs των NE κυττάρων του εντέρου με τον VMAT1 να εκφράζεται επιλεκτικά στα enterochromaffin κύτταρα (EC cells) που παράγουν σεροτονίνη και ο VMAT2 στα κύτταρα enterochromaffin-like (ECL cells) που παράγουν ισταμίνη (κυρίως κύτταρα του στομάχου), καθώς και στα κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος ^{81, 82} (Εικ. 29).

Τα κύτταρα των NENs (καρκινικά κύτταρα), παρουσιάζουν σχεδόν τα ίδια χαρακτηριστικά με τα φυσιολογικά NE κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων του εκκριτικού μηχανισμού (Εικ. 28) καθώς και των αξονικών δομών όπως η ιντερνεξίνη α ⁸³. Η εργαστηριακή μέτρηση των προϊόντων αυτού του εκκριτικού μηχανισμού όπως π.χ., η μέτρηση των γρανινών, η σεροτονίνη κλπ. είναι η βάση της διάγνωσης των NENs ⁸⁴. Ο εκκριτικός αυτός μηχανισμός είναι αρκετά περίπλοκος για να περιγραφεί εδώ με μεγάλες λεπτομέρειες, μια και τουλάχιστον 17 διαφορετικοί τύποι NE κυττάρων έχουν μέχρι σήμερα ανιχνευθεί αντανakλώντας την πληθώρα των βιοενεργών αμινών και πεπτιδίων που μπορεί αυτά τα κύτταρα να συνθέσουν και να εκκρίνουν (Εικ. 30) με κυρίαρχο ρόλο να έχει η CgA ⁸⁵, όμως μια πολύ καλή πηγή περιγραφής όλων των μηχανισμών αυτών μπορεί ο αναγνώστης να βρει [εδώ](#) ⁶ (Εικ. 28). Τα καρκινικά κύτταρα, όπως τα αντίστοιχα τους NE κύτταρα, συνθέτουν και εκκρίνουν μια παρόμοια σειρά διαφορετικών βιοδραστικών προϊόντων. Ωστόσο, η επεξεργασία στα νεοπλασματικά κύτταρα διαφέρει όχι μόνον από τα φυσιολογικά NE κύτταρα αλλά και μεταξύ των κυττάρων ενός συγκεκριμένου NEN. Ωστόσο, η παθοβιολογία των νευρικών χαρακτηριστικών των κυττάρων των NENs παραμένει σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητη. Είναι πιθανό ότι καρκινικά κύτταρα άμεσα αισθάνονται και “γεύονται” τον αυλό του εντέρου ή του αδένος ^{68, 86}, μετατρέπουν αυτά τα μηνύματα (έστω και με ένα ανεξέλεγκτο και παροξυσμικό τρόπο) και ρυθμίζουν τη συμπεριφορά των κυττάρων των βλεννογόνων, όπως τα φλεγμονώδη κύτταρα ή κύτταρα που εμπλέκονται στην ρύθμιση της κινητικότητας του εντέρου και της αίσθησης του πόνου. Αυτές οι τοπικές εκδηλώσεις και οι συστηματικές εκδηλώσεις των εκκριτικών προϊόντων των καρκινικών NE κυττάρων των NENs, παρέχουν τη βάση για τα κλινικά χαρακτηριστικά (όπως π.χ., πόνος και διάρροια) που είναι εμφανή σε κάποια GEP-NENs ⁸⁷.

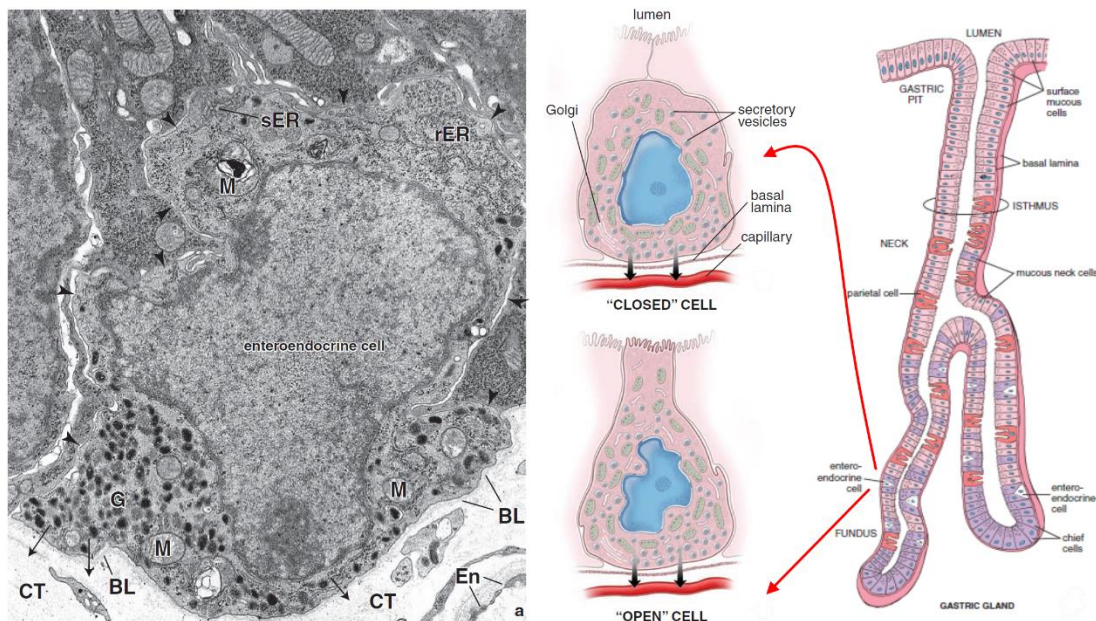
Έτσι, η επεξεργασία της CgA ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών νευροενδοκρινικών ιστών π.χ., pNENs και όγκοι επινεφρίδων, και μεταξύ pNENs από α , β , D, και παγκρεατικό πολυπεπτίδιο

(PP) κύτταρα⁸⁸, με συνέπεια διαφορετικές βιοχημικές μετρήσεις αυτής, και έτσι φυσικά η CgA του ορού δεν είναι χρήσιμη για διάγνωση πρώτης γραμμής στα NENs⁸⁹. Φαίνεται ότι μικρότερα βιολογικώς δραστικά πεπτίδια (π.χ., η vasostatin I και II, ή chromostatin)^{90, 91} με κάποιο τρόπο ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου και την ανάπτυξη μεταστάσεων⁹².

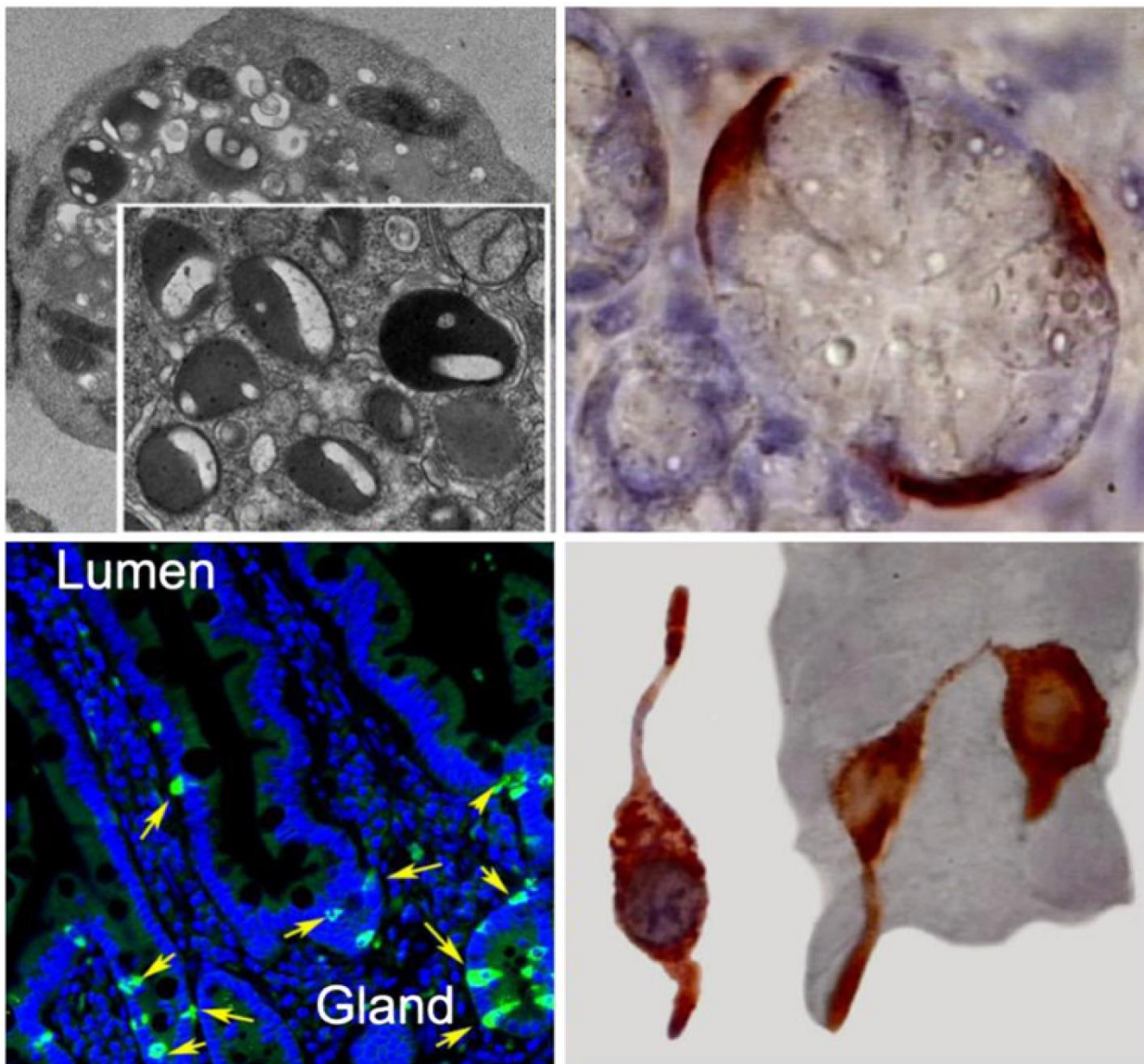
Τα NE κύτταρα στο πάγκρεας και τον ΓΕΣ φαίνεται ότι εμφανίζουν σχετικά σαφή χωροταξικό περιορισμό (compartmentalization), αν και κατανέμονται σε όλο το έντερο, για παράδειγμα τα ECL κύτταρα: στον οξυντικό γαστρικό βλεννογόνο (σώμα και τον θόλο του στομάχου), τα G κύτταρα: στο άντρο και το 12/λο¹ (Εικ. 23, 31). Τα NE κύτταρα του παγκρέατος είναι όμως συσσωρευμένα σε ειδικές περιοχές με ειδική αρχιτεκτονική (νησίδια). Έτσι π.χ., τα B κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη ευρίσκονται αποκλειστικά στα παγκρεατικά νησίδια, όμως διάφορα άλλα είδη κυττάρων είναι αποκλειστικά εντοπιζόμενα σε συγκεκριμένες περιοχές του εντέρου παρόλο που η πλειοψηφία των NE κυττάρων του εντέρου είναι διάσπαρτα σε όλους τους χώρους του ΓΕΣ, για παράδειγμα τα κύτταρα σωματοστατίνης (D) και σεροτονίνης (EC). Αυτό υποδηλώνει έναν πιο καθολικό ρόλο για τα προϊόντα αυτών των κυττάρων, όμως παρά την ομοιότητα στη κατανομή, οι όγκοι από τα EC κύτταρα (si-NENs) είναι ~ 30 φορές πιο συχνοί από τα σωματοστατινώματα. Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι ειδικά προγράμματα διαφοροποίησης ιστών ελέγχουν την «κανονική» ενδοκρινική κυτταρική ωρίμανση σε όλο το GEP σύστημα⁵⁸.

Μια δεύτερη κατηγορία των ενδοκρινικών κυττάρων του διαχύτου NE συστήματος είναι τα κύτταρα που εκκρίνουν στεροειδείς ορμόνες. Αυτά περιλαμβάνουν τον φλοιό των επινεφριδίων, και τα στεροειδογονικά κύτταρα των όρχεων και των ωοθηκών. Σε αντίθεση με άλλα ενδοκρινικά κύτταρα αυτά τα κύτταρα προέρχονται από το μεσόδερμα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Τα κύτταρα αυτά δεν αποτελούν αντικείμενο του βιβλίου αυτού αλλά αντικείμενο της χειρουργικής των ενδοκρινών αδένων και της ενδοκρινολογίας.

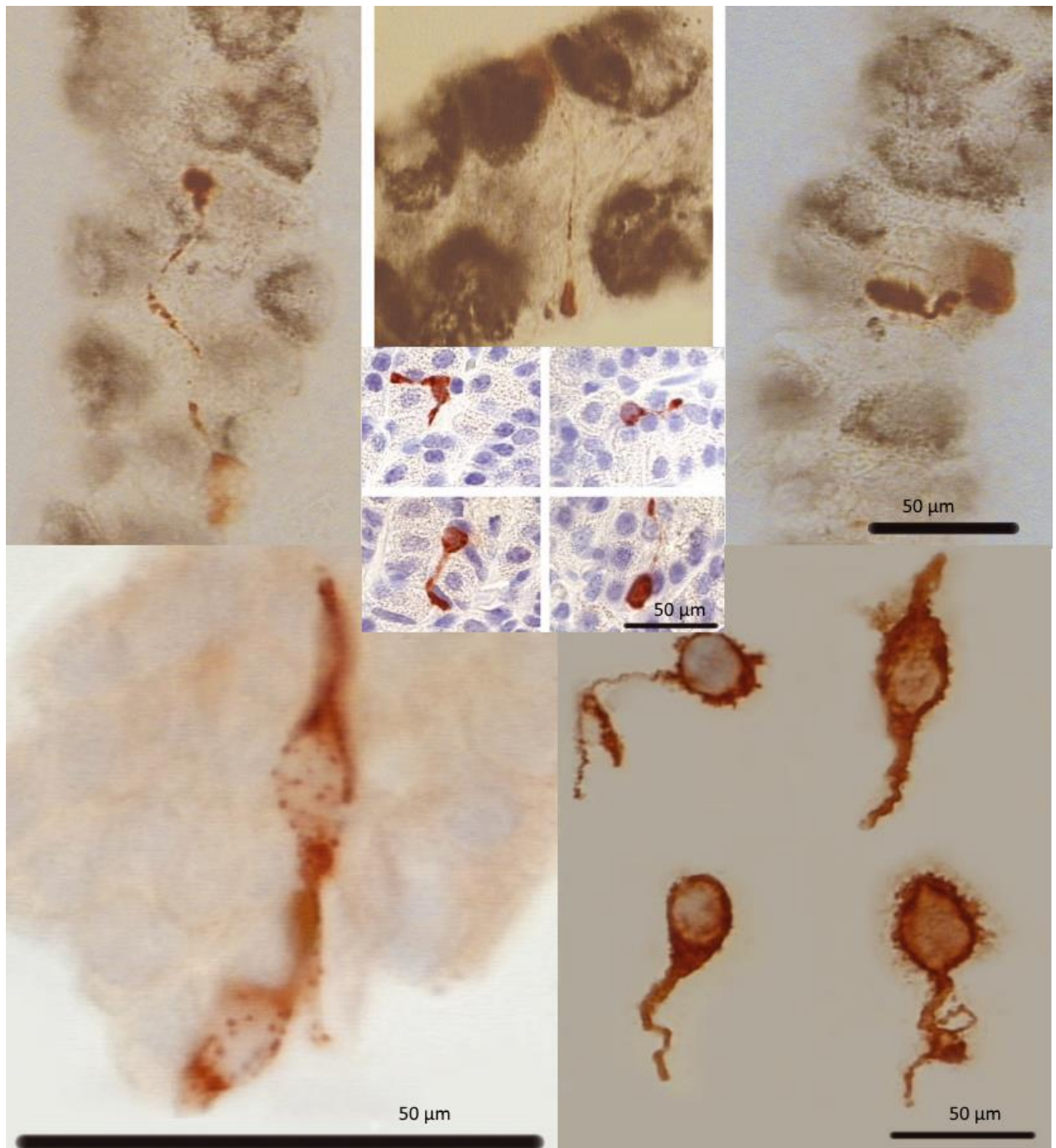
Συμπερασματικά, τα διάφορα NE κύτταρα (με πολλά κοινά αλλά και πολλά ξεχωριστά γνωρίσματα μεταξύ τους) είτε κατανέμονται όπως είπαμε διάχυτα ως «άτομα» στους βλεννογόνους, ιδιαίτερα σε εκείνον του πεπτικού συστήματος ή σχηματίζουν όργανα ή οργανωμένα συγκροτήματα κυττάρων με ενδοκρινική λειτουργία όπως η υπόφυση, οι παραθυρεοειδείς αδένες, τα παγκρεατικά νησίδια και τα παραγάγγλια. Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι κάποια νευροενδοκρινικά κύτταρα είναι επιθηλιακά και προέρχονται από το ενδόδερμα, μπορούν να σχηματίσουν αδένες π.χ., η υπόφυση, μπορούν να σχηματίσουν σχηματισμούς συμπλέγματα μέσα σε άλλα όργανα και ιστούς, π.χ., τα νησίδια του Langerhans, ή μπορεί να είναι διάσπαρτα σε άλλους ιστούς, όπως τα ενδοκρινικά κύτταρα του θύμου αδένος, του πνεύμονα και του εντέρου. Άλλα νευροενδοκρινικά κύτταρα αποτελούν τροποποιημένους νευρώνες που είναι νευροεξωδερματικής προέλευσης και δεν έχουν επιθηλιακά χαρακτηριστικά. Αυτά τα κύτταρα κατανέμονται στα συστήματα, συμπαθητικό και το παρασυμπαθητικό, και περιλαμβάνουν τον μυελό των επινεφριδίων, ως την μεγαλύτερη αδενική δομή (παραγάγγλια). Τα parafollicular C κύτταρα του θυρεοειδούς και των παραθυρεοειδών αδένων αντιπροσωπεύουν επιθηλιακά νευροενδοκρινικά κύτταρα νευροεξωδερματικής καταγωγής, τονίζοντας έτσι την έλλειψη συνάφειας στην εμβρυική καταγωγή των NE κυττάρων.



Εικόνα 21: Η μορφολογία των NE κυττάρων. Αριστερά: Ένα “closed” NE κύτταρο σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (HM) του ΓΕΣ. Τα βέλη δείχνουν τα όρια μεταξύ του NE κυττάρου και ενός επιθηλιακού κυττάρου (basal lamina, BL, βασική μεμβράνη). Αυτό το κύτταρο δεν επεκτείνεται την επιφάνεια του επιθηλίου ή του αυλού του αδένου. Πολυάριθμα εκκριτικά κοκκία (G) στη βάση του κυττάρου εκκρίνονται προς την κατεύθυνση των βελών, δια της βασικής μεμβράνης στον συνδετικό ιστό (CT). Κέντρο: Επάνω σε σχέδιο το “κλειστό” κύτταρο που δεν έχει φθάσει στην επιθηλιακή επιφάνεια. Το εκκριτικά κυστίδια χάνονται τακτικά κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας ρουτίνας. Κέντρο κάτω: Ένα “ανοικτό” NE κύτταρο που φθάνει στην επιφάνεια του επιθηλίου. Δεξιά: NE κύτταρα με την θέση τους στους αδένες του στομάχου. Οι μικρολάχνες είναι υποδοχείς όπως π.χ., taste receptors. Τα κύτταρα αυτά χρησιμεύουν ως κύτταρα χημειούποδοχείς, τα οποία παρακολουθούν το περιβάλλον στην επιφάνεια του επιθηλίου και έτσι συμμετέχουν στην ρύθμιση της έκκρισης των γαστρεντερικών ορμονών. (EN = ενδοθήλιο των τριχοειδών, M = μιτοχόνδρια, rER = ακατέργαστο ενδοπλασματικό δίκτυο, sER = λείο ενδοπλασματικό δίκτυο). Τροποποιημένη από ⁹³.



Εικόνα 22: Η μορφολογία ενός NE κυττάρου του εντέρου σε φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δείχνει την τυπική πρόσμιξη πυκνών και διαυγών κόκκων (ένθετο) που χαρακτηρίζουν τα NE κύτταρα (πάνω αριστερά). Τα NE κύτταρα κατανέμονται σε μεγάλο βαθμό στη βάση του αδένα (κάτω αριστερά, κίτρινα βέλη: χρώση ανοσοφθορισμού CgA (FITC πράσινο), οι πυρήνες είναι μπλέ (DAPI)). Μια μεγαλύτερη μεγέθυνση του βλεννογόνου αναδεικνύει EC κύτταρα που κατά κύριο λόγο βρίσκονται στην περιφέρεια του αδένα (χρώση καφέ DAB της CgA, εγκάρσια διατομή του αδένα, πάνω δεξιά). Η χρώση DAB, EC κυττάρων, αναδεικνύει μακριές αξονικές δομές (κάτω δεξιά) που φαίνεται να «συνάπτονται» με παρακείμενα κύτταρα του βλεννογόνου ή νευρώνες εντός του βλεννογόνου του εντέρου δίνοντας μας έτσι τον νευρικό φαινότυπο των NE κυττάρων . Από ¹.



Εικόνα 23: Διάφορα NE κύτταρα με τις κυτταροπλασματικές προεκτάσεις τους. Από ⁷².

Distribution of Enteroendocrine Cells				
Cell Type	Primary Location	Secondary Locations	Product	Tumor Type
A	Pancreas		Glucagon	Glucagonoma
B	Pancreas		Insulin	Insulinoma
D	Stomach, jejunum, pancreas	Ileum, appendix, colon, rectum	Somatostatin	Somatostatinoma
EC	Stomach, jejunum, ileum, appendix, colon	Rectum, pancreas	Serotonin	Carcinoid
ECL	Stomach		Histamine	Gastric carcinoid
G	Stomach (antrum)		Gastrin	Gastrinoma
I	Duodenum, jejunum	Ileum, rectum	Cholecystokinin	CCKoma
L	Small intestine		Glucagon-like peptide, peptide YY, neuropeptide Y	Neuroendocrine tumor NOS
N	Jejunum, ileum	Duodenum	Neurotensin	
PP	Pancreas		Pancreatic polypeptide	PPoma
S	Duodenum, jejunum		Secretin	
VIP	Pancreas	Stomach, small bowel, colon, rectum	Vasoactive intestinal polypeptide	VIPoma
Unknown	Pancreas	Small bowel	None known	Nonfunctional NET

Adapted from Schimmac S, Svejda B, Lawrence B, et al: The diversity and commonalities of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Langenbecks Arch Surg* 396:273, 2011; and Modlin IM, Oberg K, Chung DC, et al: Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol* 9:64, 2008.

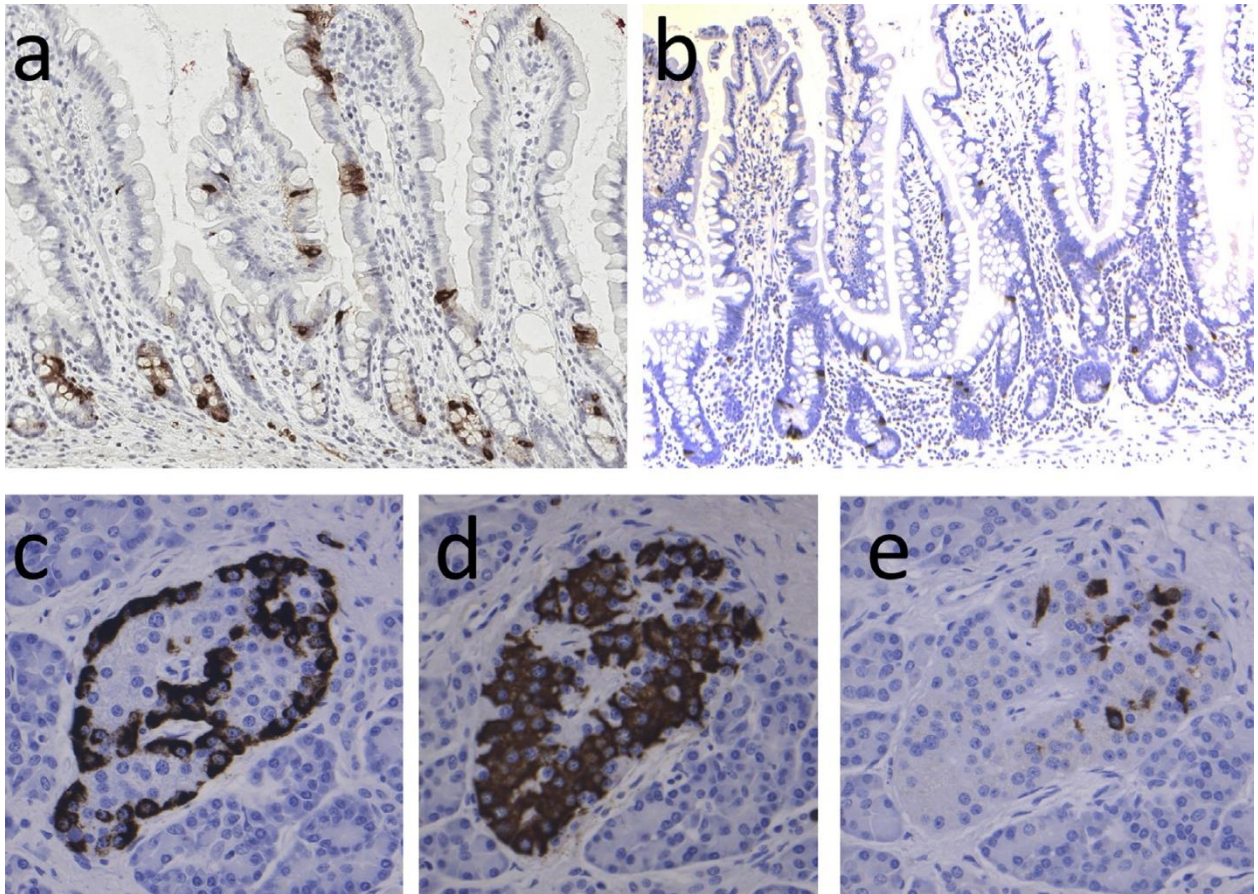
Distribution of Neuroendocrine Cells in the Gastrointestinal Tract and Pancreas*		
Cell Type	Hormone Produced	Distribution
α	Glucagon	Pancreas
β	Insulin	Pancreas
δ (D)	Somatostatin	Stomach, small intestine, pancreas, appendix, colorectum
EC	Serotonin	Stomach, small intestine, pancreas, appendix, colorectum
ECL	Histamine	Stomach
G	Gastrin	Stomach, duodenum
I	Cholecystokinin	Small intestine
K	Gastric inhibitory peptide	Small intestine
L	Glucagon-like peptide 1, peptide YY	Rectum, small intestine
M	Motilin	Small intestine
N	Neurotensin	Small intestine
P/D1	Ghrelin	Stomach, small intestine, appendix, colon
PP	Pancreatic polypeptide	Pancreas
S	Secretin	Small intestine, pancreas
VIP	Vasoactive intestinal peptide	Pancreas, stomach, small intestine, appendix, colorectum

Abbreviations: EC, enterochromaffin; ECL, enterochromaffin-like.

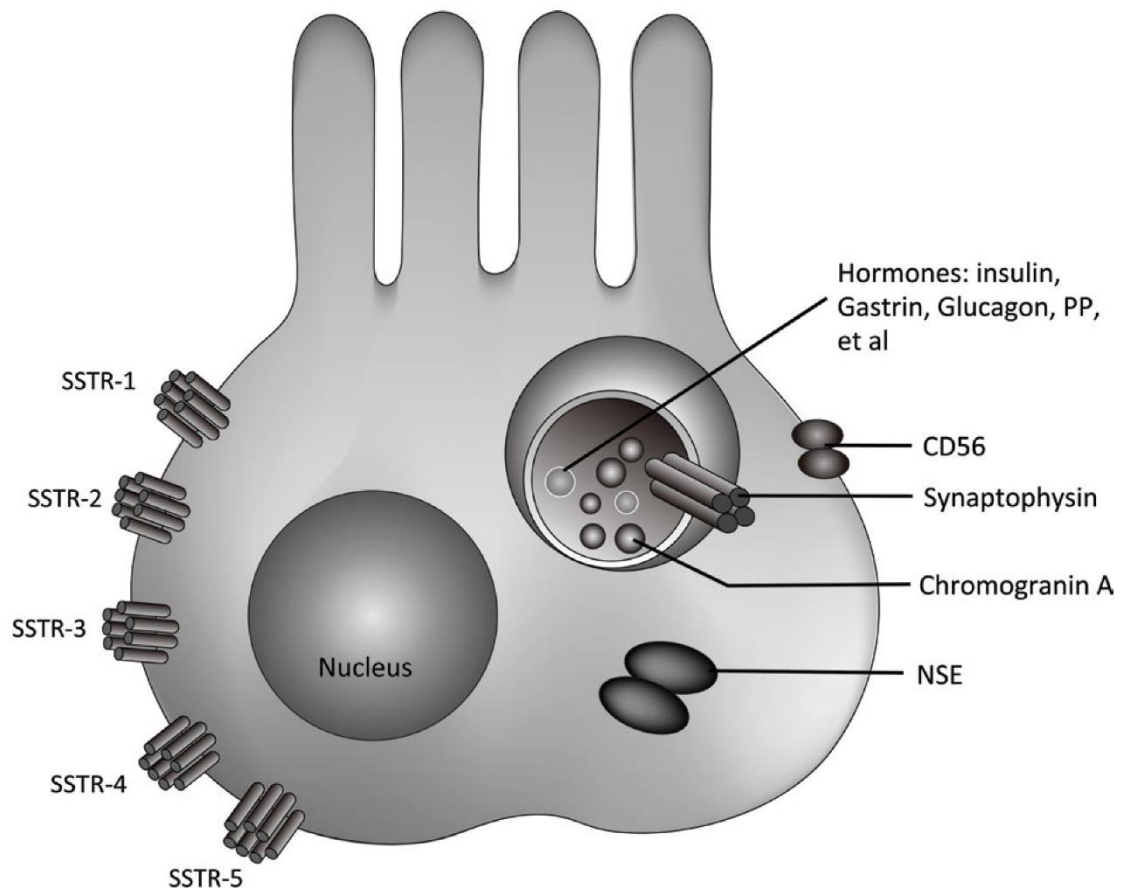
Cell type	Hormone		Vesicular marker		Localization			
	Peptide	Amine	LDCV	SLMV	Pancreas	Stomach	Small intestine	Large intestine
P/D ₁	Ghrelin		CgA, VMAT2		+	+	+	
EC		5HT	CgA, VMAT1	Syn	+	+	+	+
D	SOM		CgA	Syn	+	+	+	+
L	GLI/PYY		SgII > CgA	Syn			+	+
A	Glucagon		CgA > SgII VMAT2	Syn	+	+		
PP	PP		CgA, SgII VMAT2	Syn	+		+	
B	Insulin		CgA, VMAT2, NESP5	Syn	+			
ECL		Histamine	CgA, VMAT2	Syn		+		
G	Gastrin		CgA	Syn		+	+	
CCK	Cholecystokinin						+	
S	Secretin	5HT	CgA				+	
GIP	GIP/Xenin		CgA				+	
M	Motilin						+	
N	Neurotensin		CgA				+	

LDCV, large dense-core vesicles; SLMV, synaptic-like microvesicles; EC, enterochromaffin cell; 5HT, 5-hydroxytryptamine; SOM, somatostatin; GLI, glucagon-like immunoreactants (glicentin, glucagon-37, glucagon-29, GLP-1, GLP-2); PYY, PP-like peptide with N-terminal tyrosine amide; PP, pancreatic polypeptide; ECL, enterochromaffin-like cell; GIP, gastric inhibitory polypeptide; CgA, chromogranin A; SgII, secretogranin II; VMAT1,2, vesicular monoamine transporter 1,2; NESP5, neuroendocrine secretory protein 55; Syn, synaptophysin.

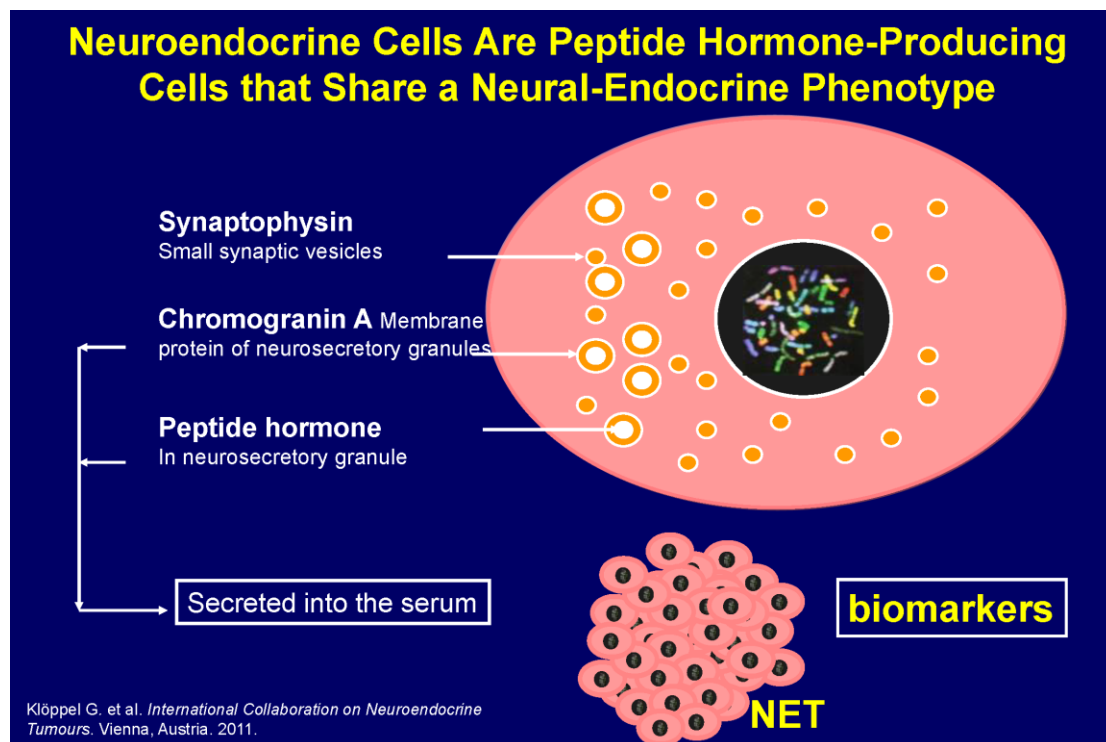
Εικόνα 24: Η κατανομή των διαφόρων NE κυττάρων στο ΓΕΣ. Τροποποιημένη από ^{58, 82, 94}.



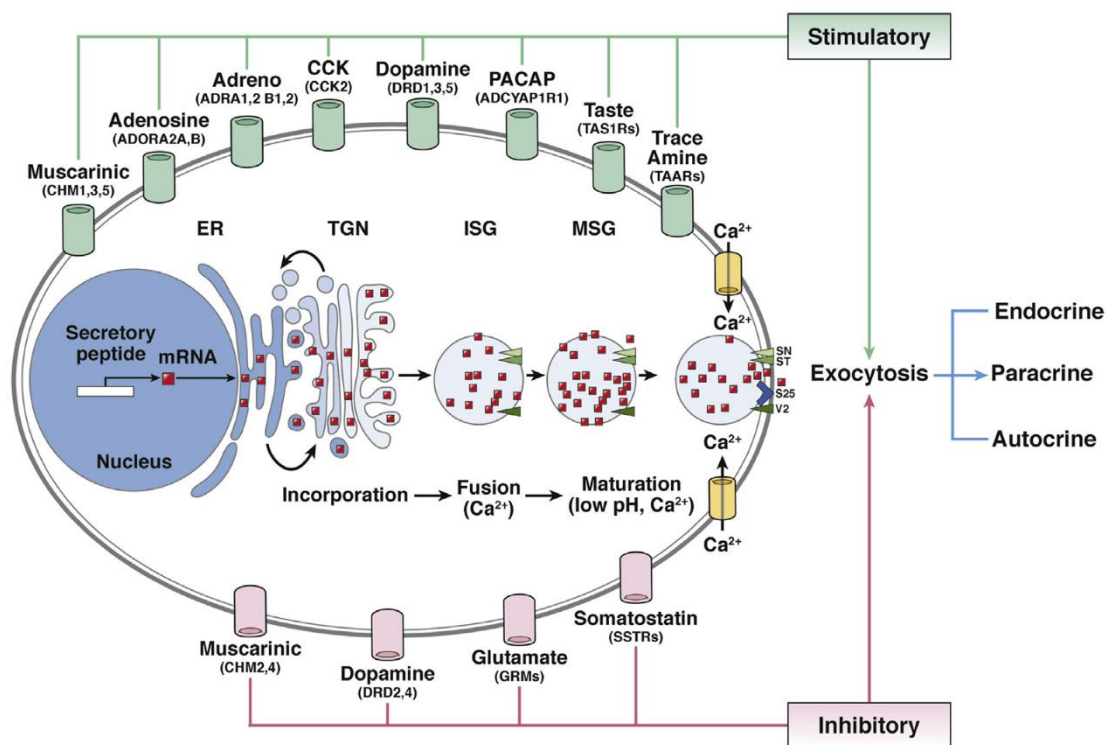
Εικόνα 25: Ανοσοϊστοχημεία των NE κυττάρων που εκκρίνουν πεπτιδικές ορμόνες (a) Τα NE κύτταρα του εντερικού επιθηλίου σε χρώση με χρωμογρανίνη (b) ένας μικρός αριθμός των θετικών στην χρωμογρανίνη κυττάρων (NE κύτταρα) εκφράζει σεροτονίνη (c) ένα νησίδιο NE κυττάρων στο πάγκρεας που εκφράζει γλουκαγόνο (A ή α κύτταρα) στην περιφέρεια των δοκίδων που περιλαμβάνει το νησίδιο (d) η κεντρική μάζα των δοκίδων του νησιδίου απαρτίζεται από (B ή β) που παράγουν ινσουλίνη. (e) διάσπαρτα τυχαία μεταξύ των κυττάρων του γλουκαγόνου και της ινσουλίνης ανευρίσκονται τα Δ ή δ κύτταρα που παράγουν σωματοστατίνη. Από ⁹⁵



Εικόνα 26: Κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ NE κυττάρων και κυττάρων των NETs ειδικά στο πάγκρεας (pNETs). CD56 neural cell adhesion molecules; NSE neuron specific enolase; PP pancreatic polypeptide; SSTR somatostatin receptors. Από ⁸.

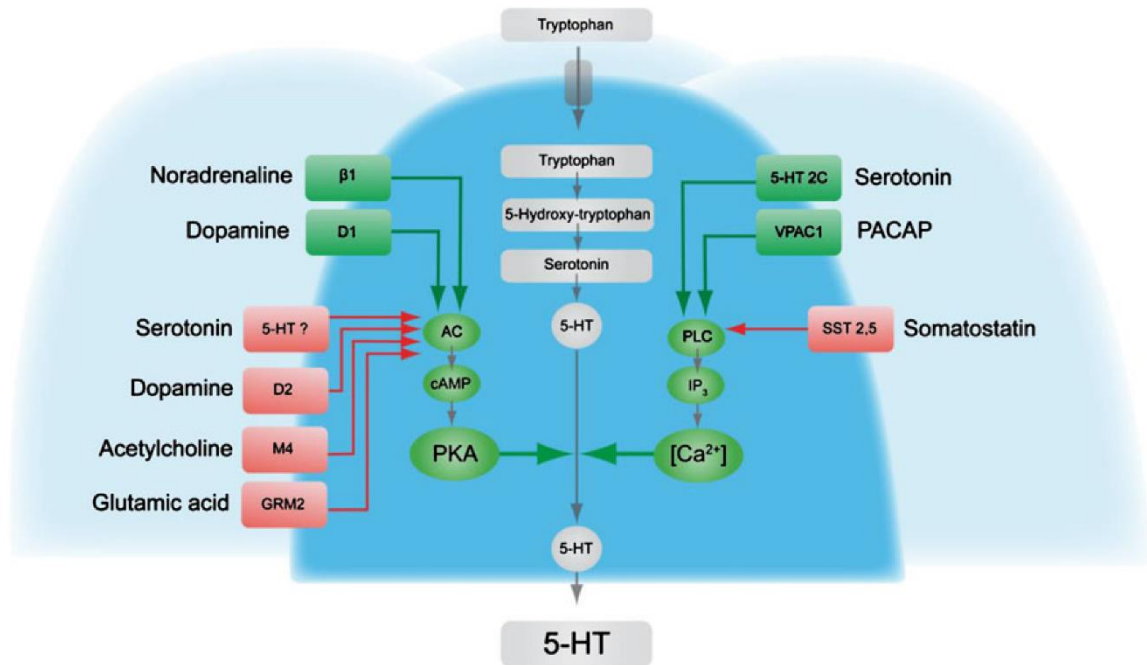


Εικόνα 27: Η έκκριση βιοδεικτών και πεπτιδικών ορμονών από τα NE κύτταρα στον ορό.



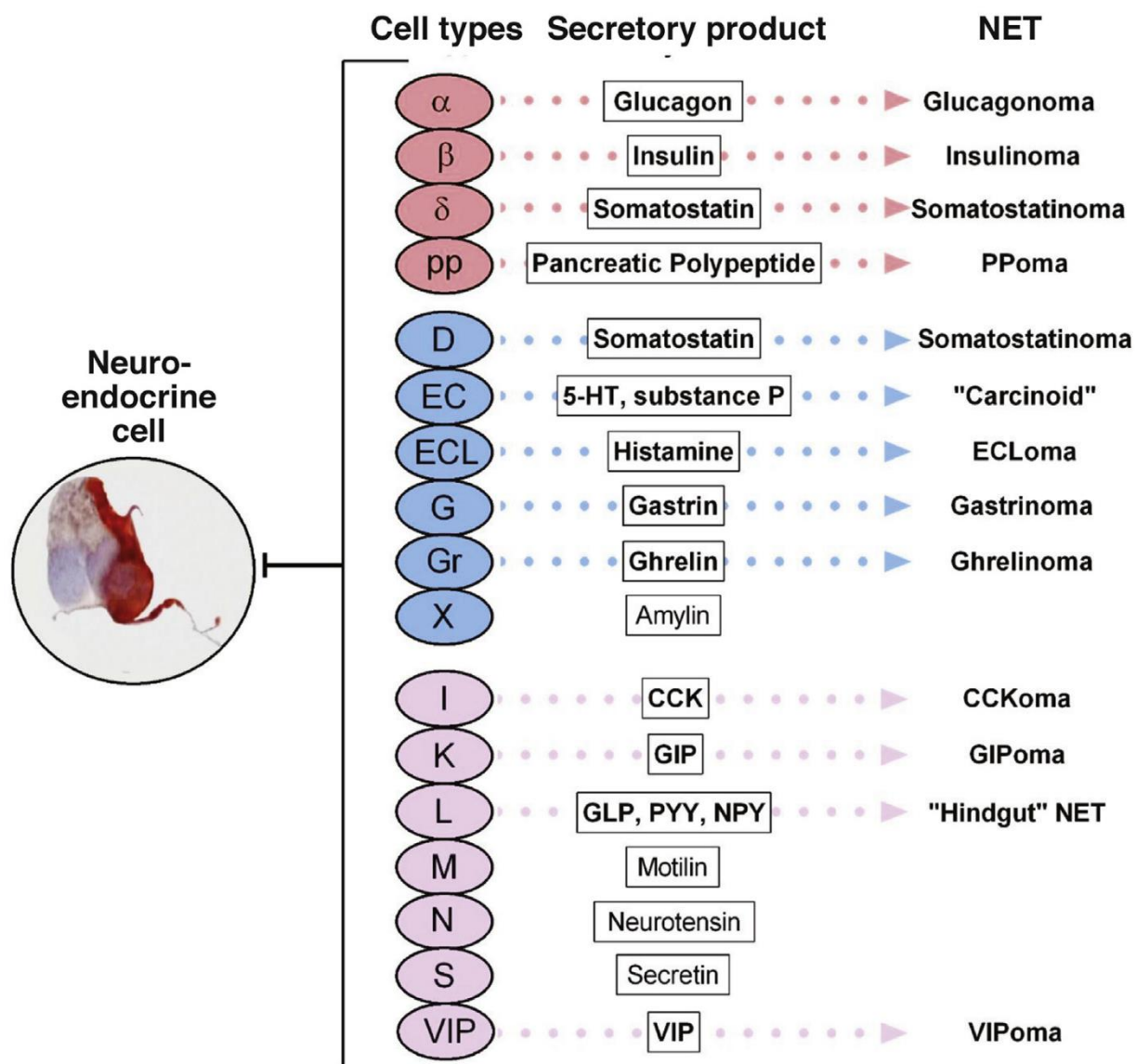
Εικόνα 28: Η μηχανιστική βάση του εκκριτικού μηχανισμού ενός NE κυττάρου που μας δείχνει βασικά την εξωκύττωση εξαρτωμένη από το ασβέστιο (Calcium-dependent exocytosis). Η αρχική μεταγραφή και επεξεργασία των εκκριτικών προϊόντων (προ-ορμόνες και προ-νευροπεπτίδια) γίνεται στον πυρήνα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και εν συνεχεία τα εκκριτικά προϊόντα συσσωρεύονται στο trans-Golgi ενδοπλασματικό δίκτυο (TGN). Στη συνέχεια, ενσωματώνονται σε ανώριμη κυστίδια που περιέχουν επίσης και άλλα πρωτεϊνικά προϊόντα που προορίζονται για να ενσωματωθούν στα ανώριμα εκκριτικά κυστίδια (ISG). Η CgA είναι μια πρωτεΐνη-κλειδί στη γένεση των κυστιδίων και ρυθμίζει τη βιογένεση των εκκριτικών πυκνού πυρήνα. Πολλαπλά ISGs συγχωνεύονται σε ένα ώριμο εκκριτικό κοκκίο (MSG) σε μια διαδικασία που περιλαμβάνει την εισροή ασβεστίου (Ca^{2+}), οξינוποίηση των κοκκίων, επεξεργασία προ-ορμονών, καθώς και πρόσληψη αμινών (π.χ., σεροτονίνη). Τα εκκριτικά προϊόντα φυλάσσονται σε μεγάλα κυστίδια πυκνού πυρήνα (LDCVs) και σε μικρά κυστίδια τύπου συνάψεων (SSVs)(τύποι MSGs). Οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με αυτά τα κυστίδια (π.χ. CgA ή συναπτοφυσίνη) έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες νευροενδοκρινικών κυττάρων ⁷⁵. Αυτές οι διαδικασίες κατευθύνεται μέσω σηματοδότησης από διάφορους διαμεμβρανικούς ρυθμιστικούς G-πρωτεϊνικούς συζευγμένους υποδοχείς (GPCRs) (πράσινο). Η σύνδεση ενός συνδέτη (αγωνιστή) στους υποδοχείς αυτούς ενεργοποιεί δύο σηματοδοτικά μονοπάτια (PKA/cAMP/MAPK και PI3K/DAG/PKC) με αποτέλεσμα αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης. Συνεπεία της ενεργοποίησης, τα ώριμα εκκριτικά κοκκία (MSGs) κατευθύνονται προς τη κυτταροπλασματική μεμβράνη, μετά την εισροή Ca^{2+} με τη μεσολάβηση του υποδοχέα, η αποδέσμευση λαμβάνει χώρα στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει την έκφραση μίας σειράς πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν syntaxin (SY), synaptotagmin (ST), vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP2) (V2), και synaptosomal-associated protein 25-kDa (SNAP25) (S25) (πράσινες κεφαλές βελών). Η επακόλουθη διαδικασία σύντηξης κυστιδίων και μεμβρανών κορυφώνεται με την απελευθέρωση των περιεχομένων των MSGs στο εξωκυτταρικό περιβάλλον (εξωκύττωση). Η αναστολή της έκκρισης λαμβάνει χώρα μέσω ενός αριθμού GPCRs (ροζ) (σωματοστατίνης> μουσκαρινικοί> γλουταμινικοί) οι οποίοι κατά την ενεργοποίησή τους αναστρέφουν την διαδικασία έναρξης της οδού σηματοδότησης μέσω της

αποφωσφορλίωσης ενδιάμεσων σηματοδοτών καθώς και απενεργοποίηση καναλιών με τάση (voltage-gated). Κόκκινες κηλίδες = εκκριτικές πρωτεΐνες. Τα σύμβολα γονιδίου IUPHAR ² περιλαμβάνονται για κάθε έναν από τους GPCRs. Από ^{1, 6, 96}.



Εικόνα 29: Η ρύθμιση της απελευθέρωσης της σεροτονίνης από τα κύτταρα εντεροχρωμομαφίνης (EC). Η τρυπτοφάνη μεταφέρεται στο κύτταρο από την κορυφαία τμήμα του που έχει επικοινωνία με τον αυλό του εντέρου και μετατρέπεται σε σεροτονίνη (5-HT) με την τρυπτοφάνη υδροξυλάση. Η σεροτονίνη συσσωρεύεται σε εκκριτικά κυστίδια τα οποία υποβάλλονται σε εξωκύτωση σε ανταπόκριση της ενεργοποίησης των κυττάρων. Θετικά ρυθμιστικά ερεθίσματα (πράσινο) περιλαμβάνουν τις νοραδρεναλίνη, ντοπαμίνη, την ίδια την σεροτονίνη και το υποφυσιακό πεπτίδιο ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης (PACAP), που διεγείρουν την έκκριση της σεροτονίνης μέσω ενεργοποίησης υποδοχέα και είτε μέσω σηματοδότησης της cAMP ή ασβεστίου (Ca^{2+}). Οι αναστολείς (κόκκινο) της έκκρισης περιλαμβάνουν τις σεροτονίνη, ντοπαμίνη, ακετυλοχολίνη, γλουταμικό οξύ και σωματοστατίνη. Θεραπευτικά η ενεργοποίηση των υποδοχέων σωματοστατίνης από ανάλογα σωματοστατίνης έχει αποδείχθηκε αποτελεσματική στην αναστολή της περίσσειας έκκρισης σεροτονίνης στο καρκινοειδές σύνδρομο. Από ¹.

² IUPHAR = International Union of Basic and Clinical Pharmacology.



Εικόνα 30: Τύποι NE κυττάρων στο πάγκρεας και το ΓΕΣ, τα εκκριτικά προϊόντα τους και πιθανά νεοπλάσματα. CCK, cholecystokinin; GIP, gastric inhibitory peptide; GLP-1, glucagon-like peptide 1; NPY, neuropeptide Y (tyrosine); PP, pancreatic polypeptide; PYY, polypeptide YY (tyrosine, tyrosine). Από ^{6,72}.

Cell type	STOM Oxy	STOM Ant	DUOD	PANC	JEJ	ILEUM	APPX	COLON	RECTUM	Bioactive product
A	n			+++						Glucagon
B				+++						Insulin
D	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	Somatostatin
EC	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	++	5-HT
ECL	+++									Histamine
G		+++	+++	n						Gastrin
Gr			+		+	+	+	+		Ghrelin
GIP			+++		+++	+			+	GIP/Xenin
I			+++		+++	+				Cholecystokinin
L			+		+	+			+++	GLI/PYY
M			+++		+++	+				Motilin
N			+		+++	+++				Neurotensin
P/D1	+++	+	+++	+, n	+++	+++				
PP			n	+++						Pancreatic Polypeptide
S			+++		+++					Secretin/5-HT
VIP	+	+	+	++	+	+	+	+	+	VIP
X	+	+								Amylin

Εικόνα 31: Η κατανομή των κυττάρων του GEP συστήματος και τα προϊόντα τους. STOM = stomach, APPX = appendix, DUOD = duodenum, JEJ = jejunum, PANC = pancreas, Ant = antrum, Oxy = oxyntic mucosa, n = neonatal and fetal period, + = few cells, ++ = cells present, +++, major site. Από ¹.

Πολλαπλασιασμός των ΝΕ κυττάρων

Γενικά και η ρύθμιση της πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας ΝΕ κυττάρων και κατά συνέπεια και των GEP-NENs, είναι ελάχιστα κατανοητή. Αυτά που μέχρι τώρα είναι σαφώς γνωστά είναι η σχέση της γαστρίνης με τα γαστρικά ECL κύτταρα και του transforming growth factor- β (TGF- β) με τα EC κύτταρα του λεπτού εντέρου. Η γαστρίνη, μέσω του υποδοχέα της χολοκυστοκίνης 2 (CCK2), είναι ο κύριος ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού των ECL κυττάρων ⁹⁷⁻⁹⁹. Όμως η ρύθμιση αυτή του πολλαπλασιασμού σπάνια, αν όχι ποτέ, οδηγεί σε νεοπλασματική εξέλιξη και οι μορφολογικές εμφανίσεις νεοπλασίας δεν συνδέονται με μεταστατική εξέλιξη ¹⁰⁰.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, μια μετάλλαξη ή η απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου *menin* αντιπροσωπεύει ένα εγγενές πρόβλημα και η υπεργαστριναιμία κορυφώνεται με την ανάπτυξη των γαστρικών καρκινοειδών τύπου II σε σύνδρομο Zollinger-Ellison σε MEN1 με κλασσικό νεοπλασματικό (διηθητικό/μεταστατικό) φαινότυπο ¹⁰¹. Σε τέτοιες περιπτώσεις η νεοπλασία είναι διάχυτη εμφάνης διηθητικά γαστρικά καρκινοειδή συμβαίνουν σε ~25% των περιπτώσεων ¹⁰². Τα γαστρινώματα (όγκοι που παράγουν γαστρίνη) φαίνεται ότι ρυθμίζονται από τον insulin-like growth factor-I (IGF-1) ¹⁰³.

Ο φυσιολογικός πολλαπλασιασμός των EC κυττάρων του λεπτού εντέρου είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστος, αλλά αναστολή της ανάπτυξης των φαίνεται ότι μεσολαβεί από τον TGF- β 1. Μόλις μετατραπούν σε ένα νεοπλασματικό φαινότυπο, τα si-NENs από τα EC κύτταρα χαρακτηρίζονται από μια απώλεια ανταπόκρισης στον TGF- β 1 ¹⁰⁴. Επίσης ο HER1 (EGFR, epidermal growth factor receptor) εκφράζεται στην πλειοψηφία (> 80%) των si-NENs και των NENs του ορθού (r-NENs) ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

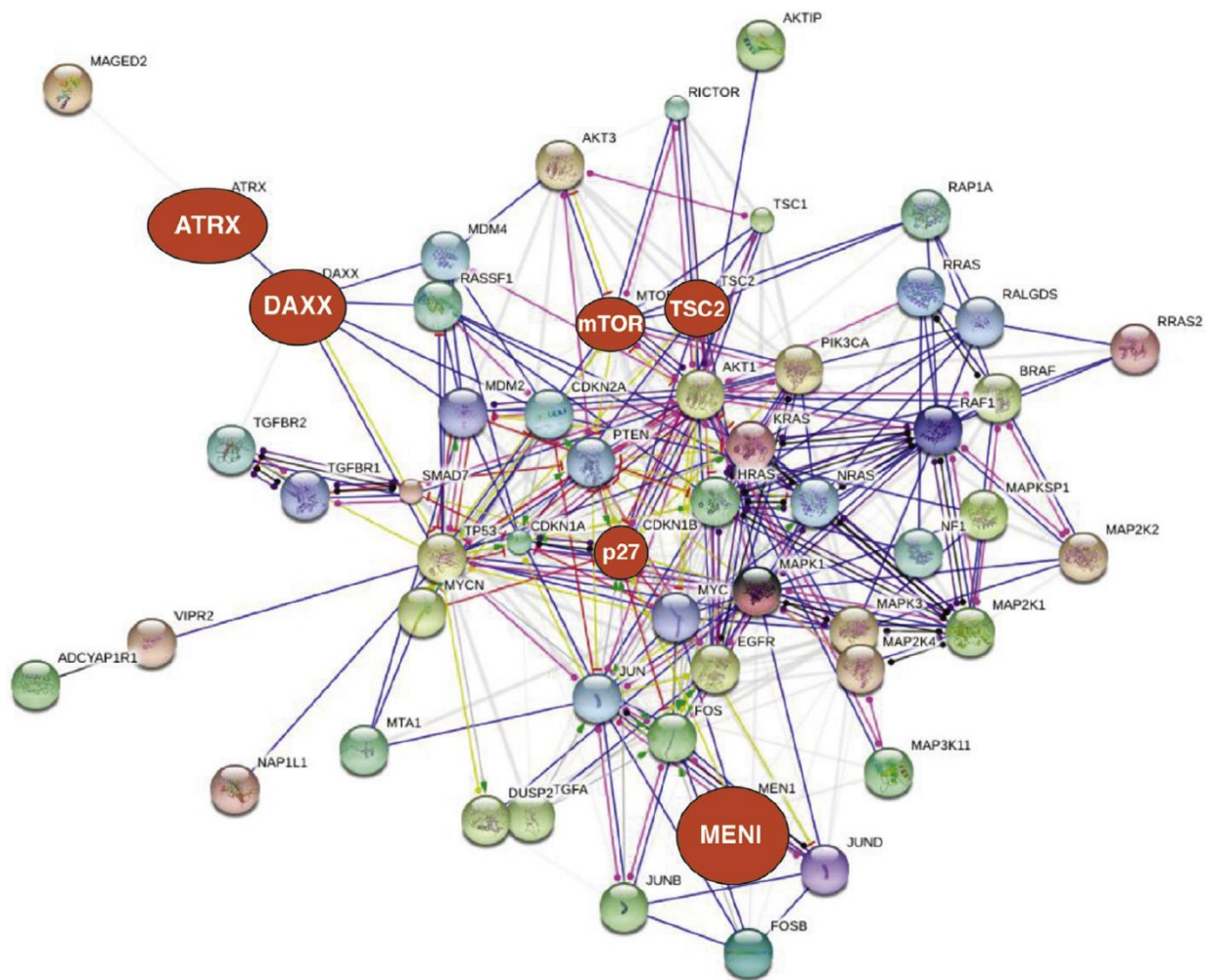
Σε αντίθεση με την περιγραφή των θετικών ρυθμιστικών αρχών του πολλαπλασιασμού των NENs, οι αναστολές του πολλαπλασιασμού έχουν πολύ καλύτερα χαρακτηριστικά, ιδιαίτερα τα ανάλογα που στοχεύουν τους υποδοχείς της σωματοστατίνης (SSAs). Η ενεργοποίηση των υποδοχέων σωματοστατίνης (SSTRs) έχει συνδεθεί με τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές ανασταλτικές επιδράσεις ¹⁰⁸ οι οποίες είναι:

1. αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, με συνέπεια μείωση του ενδοκυτταρίου cAMP με αποτέλεσμα ρύθμιση προς τα κάτω (down-regulation) του PKA.
2. ενεργοποίηση των καναλιών K^+ και Ca^{2+} , που οδηγούν στην αναστολή της διαμεμβρανικής εισροής του Ca^{2+} με αποτέλεσμα την μείωση των ενδοκυττάρων Ca^{2+} .
3. Ενεργοποίηση πρωτεϊνικών φωσφατασών (π.χ., καλσινευρίνης), οι οποίες αναστέλλουν την εξωκύτωση και της φωσφατασών της σερίνης/θρεονίνης που επηρεάζουν τα κανάλια Ca^{2+} και K^+ .
4. Ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών φωσφατασών της τυροσίνης που, μέσω διαφορετικών οδών, αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό.

Ωστόσο, παραμένει ασαφές εάν η σωματοστατίνη έχει άμεσα αντιπολλαπλασιαστική δράση ή ενεργεί μέσω της αναστολής των αυξητικών παραγόντων ή/και διαφόρων τροφικών ορμονών όπως η αυξητική ορμόνη, ο IGF-1, η ινσουλίνη, η γαστρίνη ή ο EGF, τόσο στα νεοπλασματικά κύτταρα όσο και το γύρω μεσέγχυμα¹⁰⁹. Ωστόσο, ανεξαρτήτως του μηχανισμού, τα κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν τον ρόλο αυτό των SSAs ως αρνητικός ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού των GEP-NENs^{110, 111}.

Τα GEP-NENs έχουν τρία μεγάλα σηματοδοτικά μονοπάτια: το Ras/Raf/MAPK, το PKC (Protein kinase C) και το PI3K/protein kinase B (Akt)/mTOR με κάποια συμμετοχή των Notch signaling^{112, 113}, Gli/Hedgehog/SNAIL και Src κινασών (Εικ. 32)¹¹⁴⁻¹¹⁶. Το μονοπάτι PI3K/Akt ρυθμίζει τα mTOR συμπλέγματα που θεωρούνται ως κομβικά σημεία που ρυθμίζουν την μοίρα των κυττάρων και θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης¹¹⁷. Ως μία ενδοκυττάρια πρωτεΐνη, η mTOR παίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη των κυττάρων, την πρωτεϊνική σύνθεση και την αυτοφαγία μέσω της ολοκλήρωσης της πολλαπλής εισόδου διαφόρων παραγόντων (ενάντια στο ρεύμα) όπως η ινσουλίνη, παράγοντες ανάπτυξης [IGF-I/IGF-2]), και διάφορα μιτογόνα. Επιπλέον, η mTOR λειτουργεί επίσης ως αισθητήρας των κυτταρικών θρεπτικών και ενεργειακών αποθεμάτων, καθώς και της οξειδοαναγωγικής κατάστασης¹¹⁷.

Τα δυο πιο βασικά μονοπάτια, τα μονοπάτια MAPK και PI3K/Akt, έχουν ιδιαίτερη σημασία στις μη-νευροενδοκρινικές νεοπλασματικές βλάβες με μεταλλάξεις όπως στο BRAF (στο μονοπάτι MAPK) και PTEN (στο μονοπάτι Akt)¹¹⁸ με σημαντική cross-talk μεταξύ των οδών MAPK και Akt και η ενεργοποίηση ή η αναστολή σε μία οδό, μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση σηματοδότησης σε μια δεύτερη οδό. Αυτό αντικατοπτρίζεται στην ακούσια αντοχή σε φάρμακα συνεπεία της υπερβολικής ενεργοποίησης των αντισταθμιστικών οδών^{119, 120}. Αντιθέτως, αν και τα NENs δεν εκφράζουν κοινές μεταλλάξεις των ρυθμιστικών μονοπατιών MAPK και PI3K/Akt, αυτά παρουσιάζουν ανωμαλίες (τροποποιημένα επίπεδα έκφρασης)¹²¹⁻¹²³.



Εικόνα 32: Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων με τα μονοπάτια σηματοδότησης όπως τα RAS/RAF/MAPK, και PI3K/Akt/mTOR. Οι γνωστές μεταλλάξεις της αλληλεπίδρασης αυτής είναι σε κόκκινους κύκλους με το μέγεθος του κύκλου να αντανάκλα την συχνότητα των μεταλλάξεων (π.χ., MEN1/ATR/AX/DAXX μεταλλάξεις συμβαίνουν στο 40-50%, mTOR ~15%, P27^{KIP1} ~10%). Η στόχευση των SSTRs έχει κλινική χρησιμότητα ως αντιπολλαπλασιαστική στρατηγική, αλλά δεν υπάρχει καμία άμεση σχέση μεταξύ αυτών των υποδοχέων και πολλαπλασιαστικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Επειδή αυτοί οι υποδοχείς σωματοστατίνης αλληλοεπιδρούν με την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), αυτό μπορεί να παρέχει μια πιθανή σύνδεση με τα μονοπάτια σηματοδότησης, με την έμμεση αναστολή του MAPK μονοπατιού σηματοδότησης. Σύμφωνα με τα τρέχοντα δεδομένα όμως είναι απίθανο ότι οι ανασταλτικές επιδράσεις της σωματοστατίνης σχετίζονται με αναστολή μονοπατιών σηματοδότησης. Το διάγραμμα αυτό δημιουργήθηκε με πρωτεΐνη/μεταγραφές που προσδιορίστηκαν στα νευροενδοκρινή νεοπλάσματα String v9.1¹²⁴. Από⁶.

Νευροενδοκρινείς όγκοι: αιτιολογία και παθογένεια

Τα NENs γενικά πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύουν κακοήγη μετασχηματισμό είτε τελικά διαφοροποιημένων NE κυττάρων ή προγονικών/βλαστικών κυττάρων. Ο μηχανισμός αυτών των γεγονότων είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Οι όγκοι αυτοί είναι πολύπλοκοι και ετερογενείς (Εικ. 33, 34) και η περαιτέρω ανάγνωση του κεφαλαίου θα αναδείξει όλα αυτά.

Μια υπόθεση είναι ότι οι βλάβες στα αρχέγονα προγονικά NE κύτταρα οδηγεί στην ανάπτυξη των NECs, και τα G1/G2 NENs αναπτύσσονται από μεταγενέστερα στάδια διαφοροποίησης ή μερικώς διαφοροποιημένα κύτταρα (Εικ. 35). Οι μηχανισμοί δημιουργίας των όγκων αυτών δεν είναι γνωστοί, αλλά τα επακόλουθα σε μεγάλο βαθμό θεωρείται ότι είναι είτε επιγενετικές τροποποιήσεις, για παράδειγμα διαφορές στην ακετυλίωση των ιστονών ή χρωμοσωματική μεθυλίωση ή αυθόρμητες μεταλλάξεις σε κρίσιμα γονίδια, όπως π.χ., στο γονίδιο MEN1¹²⁵. Υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία, παρόλο που είναι μια ελκυστική θεωρία, που να στηρίζουν την υπόθεση της εξέλιξη από G1 NEN σε G2 NEN σε G3 NEN και τελικά σε NEC (η λεγόμενη «NET-NEC ακολουθία»)¹²⁶.

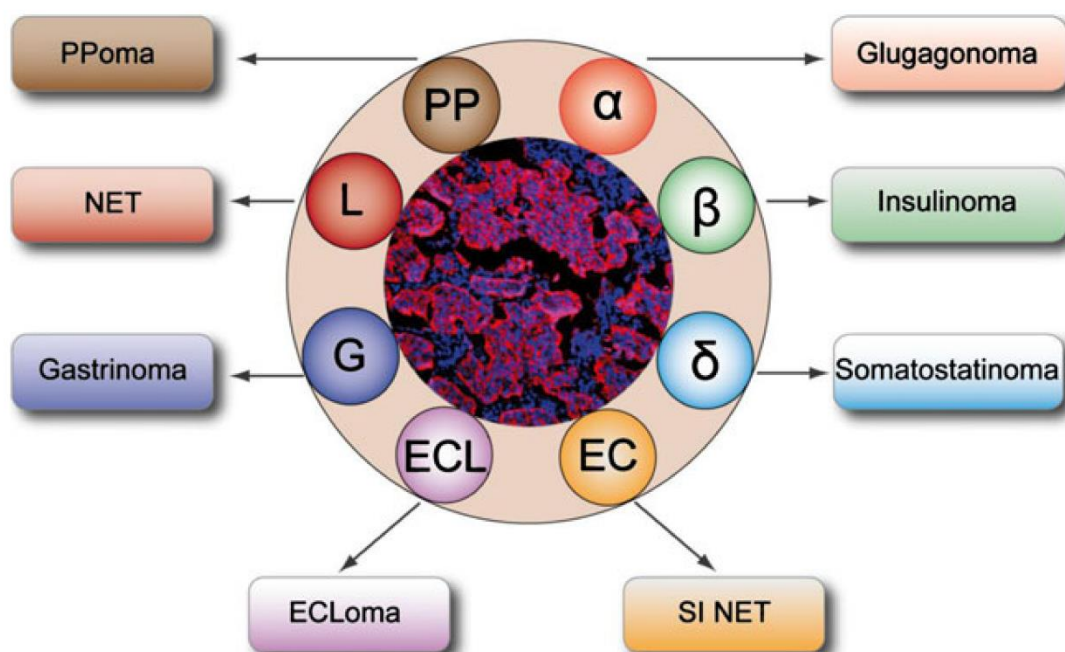
Ενώ η πλειοψηφία (> 95%) των GEP-NENs είναι σποραδικά⁸⁷, ένα μικρό ποσοστό είναι είτε οικογενή, είτε σχετίζονται με τέσσερα ανεξάρτητα αυτοσωματικά κυρίαρχα κληρονομικά σύνδρομα όπως τα MEN 1 (το πιο συχνό), την νόσο VHL, την νόσο von Recklinghausen ή νευροϊνωμάτωση (NF1), την οζώδη σκλήρυνση (TSC)¹, και με όσα από αυτά τα σύνδρομα προκαλούν GEP-NENs επίσημα, θα ασχοληθούμε σε ειδικό κεφάλαιο. Επίσης είναι σαφές ότι και τα σποραδικά GEP-NENs έχουν και οικογενή βάση^{1, 6, 127-131}. Έτσι ο σχετικός κίνδυνος (RR) για άτομα με οικογενειακό ιστορικό NEN είναι 4,33, με ιστορικό αδελφών ο RR 2,88, ενώ τα παιδιά γονιών με ιστορικό NENs έχουν RR 11,80 για την ανάπτυξη si-NENs και RR 2,78 για NENs παχέος εντέρου¹.

Είδαμε σε όλα αυτά πιο πάνω ότι τα NETs και δη τα GEP-NENs εμφανίζουν σημαντικές κυτταρικές και κλινικές διαφορές περισσότερο από ότι θεωρούσαμε παλιότερα. Ο κάθε τύπος NEN θε πρέπει να θεωρείται και να εξετάζεται ως ξεχωριστή οντότητα. Σε γενικές γραμμές οι όγκοι παρουσιάζουν κοινά στοιχεία, καθώς και σημαντική ποικιλομορφία. Οι **ομοιότητες** τους (κοινά στοιχεία) περιλαμβάνουν κοινούς εκκριτικούς μηχανισμούς και φυσιολογικές ανταποκρίσεις (νευρωνικούς/ορμονικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς), σχετικά υψηλό ποσοστό σποραδικών όγκων και ανάπτυξη από πρόδρομα κύτταρα. Συνολικά υπάρχει μια έλλειψη πληροφορίας σχετικά με το μετασχηματισμό από φυσιολογικά σε νεοπλασματικά κύτταρα, εκτός από το ότι η μικροδορυφορική αστάθεια^{132, 133} και οι μεταλλάξεις του K-RAS¹ δεν συμβαίνουν τόσο συχνά όπως στην καρκινογένεση των αδενοκαρκινωμάτων. Οι **διαφορές** τους περιλαμβάνουν περιορισμούς στην ανατομική χωροταξική κατανομή τους (π.χ., τα γαστρικά ECL κύτταρα σε σύγκριση με την εκτεταμένη κατανομή των EC κυττάρων), τον σημαντικά διαφορετικό τρόπο ανάπτυξης κάποιων (τα gNENs type I και τα ινσουλινώματα), που οδηγεί στην σχετικά καλοήγη φύση (υψηλή μακροχρόνια επιβίωση) σε σύγκριση με άλλα GEP-NENs όπως τα NENs του παχέος εντέρου ή τα NF-pNENs. Επίσης υπάρχει σημαντική διαφορά σε χρωμοσωματικές ανωμαλίες (και δυνητικά στην αιτιοπαθογένεια) μεταξύ pNENs και si-NENs και στη σχετική έλλειψη πληροφοριών σχετικά με την ρύθμιση της ανάπτυξης αυτών των όγκων (εκτός από τα γαστρικά ECL κύτταρα).

Tumor	Putative Cell of Origin	Localization	Secretory Products	Secretory Regulation	Proliferative Regulation	Omics-Based Analyses	Mutations
Small intestinal NEN, "carcinoid"	Enterochromaffin (EC)	Entire GI tract	Serotonin, substance P, guanylin, melatonin	Immune (eg, IL1 β), mechanical (eg, ATP), neural (eg, adrenaline), somatostatin (PKA, MAPK)	TGF β , EGFR (RAS/RAF/MAPK, GLI1/SNAI1)	Transcriptome, LOH, exome, miRNAome	CDKN1B
Nonfunctional pancreatic NEN	Precursor (ductal) cell or omnipotent stem cell	Pancreas	None defined	Calcium dependent	Growth factors (eg, VEGF), PI3K, Akt, mTOR	Transcriptome, LOH, exome, miRNAome	MEN-1, DAXX, ATRX
Colorectal NEN	L, EC	Colon-rectum	GLP-1, PYY, NPY	Nutrient sensing ^a	EC: ATM)	EC: Transcriptome, LOH, exome, miRNAome	—
ECLoma (type I-III)	Enterochromaffin-like (ECL)	Gastric fundus	Histamine	Gastrin, muscarinic, vagal (PI3K/DAG/calcium signaling), somatostatin	Gastrin, PACAP, histamine, EGFR (MAPK)	Transcriptome, LOH	None (type II: MEN-1)
Gastrinoma	Gastrin (G)	Gastric antrum and duodenum, pancreas	Gastrin	Environmental (amino acids, tastants, calcium, pH), mechanical, vagal (PKA, MAPK, calcium signaling), somatostatin	IGF-1	Transcriptome, LOH	MEN-1
CCKoma	I	Duodenum	CCK	Environmental (amino and fatty acids), vagal	—	—	—
GIPoma	K	Duodenum, jejunum	GIP	Nutrient sensing ^a	—	—	—
Insulinoma	Beta	Pancreas	Insulin	GIP, GLP-1, leptin, somatostatin (depolarization, calcium)	mTOR	Transcriptome, LOH, exome	YY1
Glucagonoma	Alpha	Pancreas	Glucagon	GIP, GLP-1, somatostatin (depolarization, calcium)	—	Transcriptome, LOH	MEN-1
Somatostatinoma	Delta	Pancreas	Somatostatin	—	Src family kinases, PI3K-mTOR, MEK	—	NF-1
Somatostatinoma	Delta (D)	Duodenum	Somatostatin	—	Src family kinases, PI3K-mTOR, MEK	—	—
Ghrelinoma	Ghrelin (Gr)	Entire GI tract	Ghrelin	β 1-adrenergic receptor	—	—	—
PPoma	PP	Pancreas	PP	—	—	—	—
VIPoma	VIP	Entire GI tract (pancreas, adrenal)	VIP	—	—	—	—

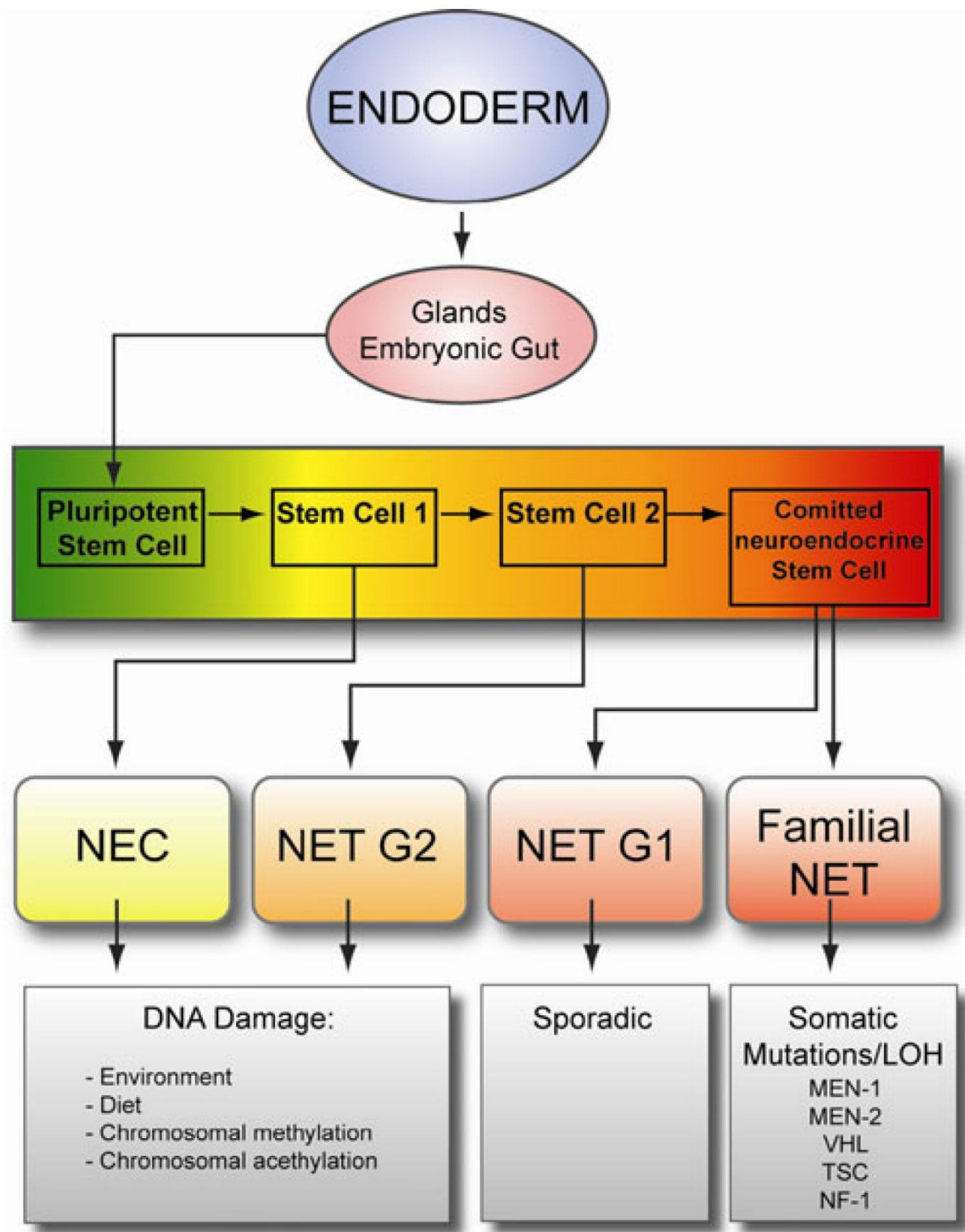
Note: Akt, protein kinase B; ATM, ataxia telangiectasia mutated kinase; ATP, adenosine triphosphate; ATRX, alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked; CCK, cholecystokinin; DAG, diacylglycerol; DAXX, death-domain associated protein; EC, enterochromaffin; EGFR, epidermal growth factor receptor; GI, gastrointestinal; GIP, gastric inhibitory peptide; GLP-1, glucagon-like peptide 1; IGF, insulin-like growth factor; IL, interleukin; LOH, loss of heterozygosity; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; MEN-1/MEN1, multiple endocrine neoplasia type 1; mTOR, mammalian target of rapamycin; PP, pancreatic polypeptide; PYY, polypeptide YY (tyrosine, tyrosine); NEN, neuroendocrine neoplasms; NF-1, nuclear factor 1; NPY, neuropeptide Y (tyrosine); PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PI3K, phosphoinositide-3 kinase; PKA, protein kinase A; PP, pancreatic polypeptide; VEGF, vascular endothelial growth factor; VIP, vasoactive intestinal peptide; YY1, Yin Yang 1 transcriptional repressor; —, no data.
^aSignaling pathways associated with nutrient sensing are poorly characterized.

Εικόνα 33: Ετερογένεια και πολυμορφία στην νευροενδοκρινικών όγκων γαστρεντερικού συστήματος και του παγκρέατος. Από ⁶.



Εικόνα 34: NE κύτταρα και NENs. Επιμέρους NE κύτταρα (κύκλοι) και τα NENs με τα οποία σχετίζονται (ορθογώνια) αντιπροσωπεύουν τα πιο συχνά κλινικά ανευρισκόμενα GEP-NENs. Η χρωμογρανίνη Α (CgA) είναι θετική στην ανοσοϊστοχημεία (κεντρικός κύκλος) σε ένα NEN (red = Cy-5 labeled CgA, blue = DAPI (nuclear stain)) είναι ο πιο συχνός ιστοπαθολογικός βιοδείκτης στα NENs.

Η πλειοψηφία των NENs (> 90%) εκφράζουν CgA αλλά οι φτωχά διαφοροποιημένα αλλοιώσεις (NEC και G3 βλάβες) μπορεί να απωλέσουν τον νευροενδοκρινικό φαινότυπο τους και να είναι CgA αρνητικές βλάβες. Από ¹.



Εικόνα 35: Υποθετικά μετασχηματιστικά γεγονότα στην ανάπτυξη των GEP-NETs (NENs). Τα NETs αναπτύσσονται στους κληρονομικούς/οικογενειακούς όγκους του στομάχου (gNENs type II) και του παγκρέατος (pNENs) ως συνέπεια είτε ενός δεύτερου hit είτε LOH. Οι σωματικές μεταλλάξεις, το πιο

συνηθισμένο γεγονός, ίσως λόγω περιβαλλοντικής διαταραχής σε κάποιο πρόδρομο κυτταρικό στάδιο, οδηγούν σε καλά διαφοροποιημένα NET (NET-G1). Εάν η πρόκληση βλάβης εμφανίζεται νωρίς στην πρόοδο των βλαστικών κυττάρων (π.χ., το βλαστικό κύτταρο 1), αναπτύσσονται κακώς διαφοροποιημένα νευροενδοκρινικά καρκινώματα (NEC). Αν προκύψει βλάβη σε μεταγενέστερο στάδιο, για παράδειγμα σε ένα πολυδύναμο κύτταρο (βλαστικό κύτταρο 2), τότε η συνέπεια είναι ένα καλά διαφοροποιημένο NET(G2-NET) και ανάλογα για ένα G1-NET κλπ. Υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για την εξέλιξη από ένα NET σε ένα NEC σε αυτό το σχήμα¹²⁵ που θα δούμε στα επόμενα κεφάλαια στα pNENs. Από ¹.

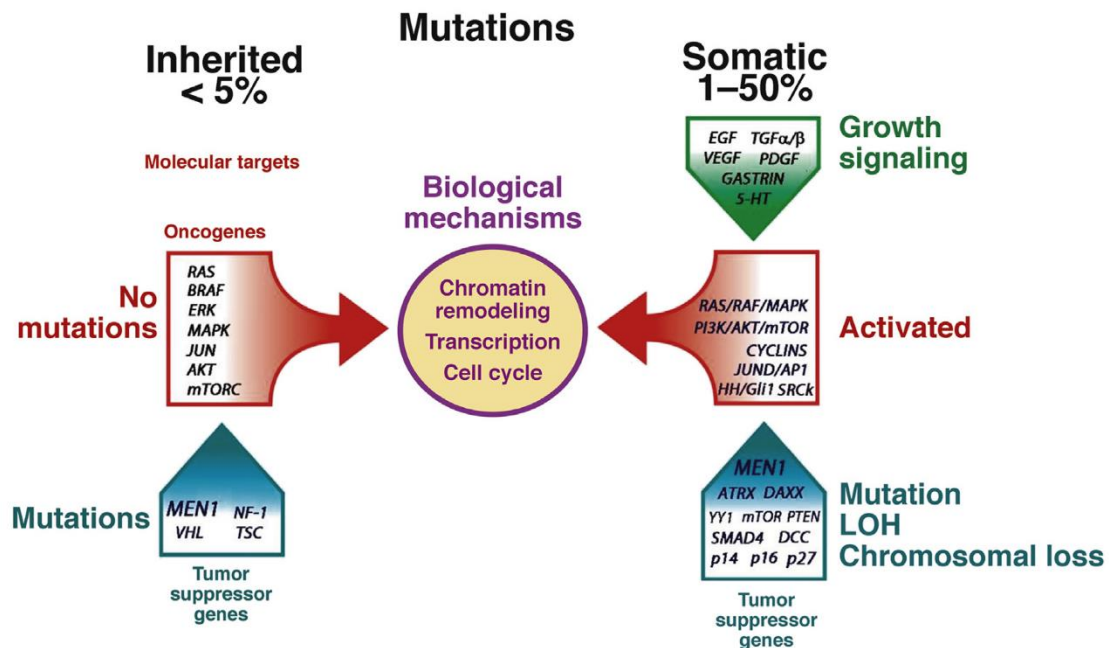
Η νεοπλασματική μεταμόρφωση στα GEP-NENs

Τα περισσότερα νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα του λεπτού και του παχέος εντέρου εμφανίζονται σποραδικά. Άλλα, ιδιαίτερα τα gNENs των κυττάρων ECL του στομάχου, σχετίζονται με υπερπλασία των κυττάρων ECL, συνήθως λόγω υπεργαστριναιμίας, άλλα, όπως τα νεοπλάσματα των G-κυττάρων που περιέχουν γαστρίνη και νεοπλάσματα των D-κυττάρων του δωδεκαδακτύλου που εκκρίνουν σωματοστατίνη καθώς και τα κληρονομούμενα pNENs NEN συσχετίζονται με το σύνδρομο MEN1 ¹³⁴. Τα pNENs δεν είναι νεοπλασματικός μετασχηματισμός των νησιδίων και μάλλον φαίνεται να προέρχονται από τα πολυδύναμα κύτταρα στο σύστημα των πόρων/κυψελών (ductal/acinar system) ¹³⁵. Φαίνεται ότι τα GEP-NENs φαίνεται να προέρχονται από τοπικά ειδικά του ιστού NE που προέρχονται από βλαστικά κύτταρα που ευρίσκονται στον ΓΕΣ και το πάγκρεας. Τα βλαστικά αυτά κύτταρα εξελίσσονται από ένα για αυτό τον ρόλο **δεσμευμένο πρόδρομο κύτταρο** εντός των εντερικών κρυπτών ¹³⁶ ή στο επιθήλιο του παγκρεατικού πόρου ⁴⁹. Οι παράγοντες μεταγραφής που εμπλέκονται στη ρύθμιση του νευροενδοκρινικού φαινοτύπου, όπως τα γονίδια PAX και η νευρογενίνη 3 (NGN3), δεν θεωρούνται ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην εξέλιξη των NENs ⁶ (Εικ. 20).

Η υπόθεση Knudson (two-hit hypothesis ή multiple-hit hypothesis), είναι η υπόθεση σύμφωνα με την οποία ο καρκίνος είναι το αποτέλεσμα συσσωρευμένων μεταλλάξεων στο DNA ενός κυττάρου. Αρχικά προτάθηκε από τον Carl O. Nordling το 1953 ¹³⁷ και αργότερα διατυπώθηκε από τον Alfred G. Knudson το 1971 ¹³⁸. Η θεωρία αυτή είναι καλά αποδεκτή για την καρκινογένεση (non-NEN), και προτείνει ότι τα νεοπλάσματα προκύπτουν ως αποτέλεσμα μιας αποκτηθείσας γονιδιωματικής αστάθειας και της επακόλουθης εξέλιξης των καρκινικών κυττάρων με μεταβλητά μοτίβα καρκινογένεσης ¹³⁸. Η θεωρία αυτή (Knudson's work) οδήγησε έμμεσα στον εντοπισμό των γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο. Έτσι ανευρέθησαν γονίδια όπως τα πρώτο-ογκογονίδια (π.χ. γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό) και αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου όταν ενεργοποιούνται ¹³⁹, αλλά η καρκινογένεση απαιτεί γενικά και μηχανισμούς επισκευής του DNA, όπως τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (TSGs), να είναι επίσης αδρανοποιημένα ^{138, 140}. Πολλές μεταλλάξεις ενεργοποίησης (π.χ. BRAF V60E) (βλέπε: <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>) έχουν ανευρεθεί. Ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν επίσης αναγνωριστεί, αλλά είναι λιγότερα σε αριθμό. Η μοντελοποίηση της ενεργοποίησης των γονιδίων του καρκίνου, και οι μελέτες της εξέλιξης των μηχανισμών κυτταρικής άμυνας, έδειξαν ότι τα πρώτο-ογκογονίδια συχνά ενεργοποιούνται πρώτα, με απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων ως δεύτερο βήμα πριν από την κυτταρική απελευθέρωση και την εμφάνιση του όγκου ¹⁴¹. Αυτή η σειρά είναι συμβατή με το κλασικό μοντέλο καρκινογένεσης του Knudson.

Σε αντίθεση με την πλειονότητα των καρκίνων, στα GEP-NENs, οι ενεργοποιείς μεταλλάξεις είναι σπάνιες, αν δεν είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστες (Εικ. 36). Τελευταία έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της μοριακής βιολογίας των NENs. Έτσι έχει βρεθεί ότι τα πιο

συχνά μεταλλαγμένα γονίδια στα σποραδικά pNENs είναι το γονίδιο *MEN-1* (44%), *DAXX/ATRX* (43%) και τα γονίδια του μονοπατιού της mTOR (15%)¹⁴².



Εικόνα 36: Κληρονομικές μεταλλάξεις έχουν προσδιοριστεί μόνο στα ογκοκατασταλτικά γονίδια (TSGs), και συμβαίνουν σε < 5% όλων των GEP-NENs. Αν και δεν έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις ενεργοποίησης σε γνωστούς μοριακούς στόχους (π.χ. RAS ή BRAF), τα βιολογικά αποτελέσματα της απώλειας των TSGs (χρωματίνη και μεταγραφικές αλλοιώσεις καθώς και μεταβολές στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου) είναι συνέπεια μεταβολών που σηματοδοτούνται από αυτά τα ογκογονίδια. Το δεύτερο "χτύπημα" υπό αυτές τις συνθήκες παραμένει να προσδιοριστεί. Οι σωματικές μεταλλάξεις είναι πιο συχνές και έχουν εντοπιστεί σε ποσοστό 1-50% των GEP-NENs. Αυτές συνήθως περιλαμβάνουν μεταλλάξεις, απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) και χρωμοσωμικές αλλαγές (π.χ. διαταραχές τελομερών ή αστάθειες) που έχουν ως αποτέλεσμα ενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των κινάσων των μονοπατιών RAS/RAF/MAPK, PI3K/Akt/mTOR, Src ή τροποποιήσεων των ιστονών. Οι σωματικές αυτές μεταλλάξεις παρουσιάζουν παρόμοιες βιολογικές συνέπειες όπως οι κληρονομικές μεταλλάξεις. Το περιβάλλον ρύθμισης της ανάπτυξης και η προ-πολλαπλασιαστική σηματοδότηση, όπως μέσω αυξητικών παραγόντων, πιθανόν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη των όγκων. Οι μοριακές αλλοιώσεις σε επίπεδο DNA παραμένουν απροσδιόριστες στο ~50% των όγκων. Από⁶.

Μοριακά γεγονότα στα pNENs

Η υφιστάμενη γνώση των μοριακών χαρακτηριστικών των pNENs έχει περιορισμένες εφαρμογές στην κλινική πρακτική, αλλά σημαντικές προσπάθειες γίνονται για αυξημένες θεραπευτικές επιλογές με στοχευμένες θεραπείες ακολουθώντας την γνώση των μοριακών χαρακτηριστικών των NENs. Εκτός από τα κληρονομικά νεοπλάσματα (αυτά που εκδηλώνουν εμβρυϊκές μεταλλάξεις στο *MEN-1*), λίγα είναι γνωστά για την μοριακή βάση της ογκογένεσης ή της εξέλιξης των σποραδικών pNENs που είναι η πλειοψηφία των pNENs^{143, 144}.

Οι κλασσικές μεταλλάξεις στα K-RAS, P53, MYC, FOS, JUN, SRC, TGFBR1/SMAD3/SMAD4, CDKN2A και RB γονίδια δεν έχουν ενοχοποιηθεί μια και ανευρίσκονται μόνο στο 0-3% των pNENs^{142, 144-147}. Το K-RAS, παραδόξως, έχει ενοχοποιηθεί για την καταστολή μάλλον παρά τον πολλαπλασιασμό των ενδοκρινικών κυττάρων. Έτσι θεωρείται ότι τα pNENs εξελίσσονται από

διαφορετική οδό από το αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος (PAC) και παρουσιάζουν ελάχιστη επικάλυψη στα κύρια γονίδια που μεταλλάσσονται και στους δυο τύπους όγκων^{142, 145}.

Η μετάλλαξη (απενεργοποίηση) της βλαστικής σειράς του γονιδίου MEN1 προκαλεί το σύνδρομο MEN1, αλλά βρέθηκε ότι το γονίδιο MEN1 μεταλλάσσεται και στο 20% τουλάχιστον των σποραδικών pNENs^{142, 148}. Το γονίδιο MEN1 που βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 11, ζώνη q13¹⁴⁹ και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μενίνη (menin) και μεταλλάσσεται σε ασθενείς με MEN1 και σημαντική αναλογία σποραδικών pNENs. Το MEN1 λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο και είναι κρίσιμο για την φυσιολογική παγκρεατική ομοιοστάση των β κυττάρων και την παρακολούθηση των επιπέδων της γλυκόζης¹⁵⁰. Η menin προάγει την έκφραση των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου και η υπερέκφραση της καταργεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων β¹⁴⁸. Μέσω της μενίνης, αρχίζει η διαδικασία της ογκογένεσης¹⁵¹. Η ογκογένεση πιθανόν να οφείλεται στην απώλεια λειτουργίας αυτού του ογκοκατασταλτικού γονιδίου¹³⁸, και θεωρείται ότι ακολουθεί μια διαδικασία δύο σταδίων: μία γενετική μετάλλαξη επηρεάζει το πρώτο αλληλόμορφο MEN1 και μια δεύτερη σωματική απενεργοποίηση του μη προσβεβλημένου αλληλομόρφου (LOH). Η απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) στη θέση MEN1 (π.χ., 11p13q) παραμένει η συχνότερη μεταβολή στα pNENs και δεν έχουν εντοπισθεί νέες ενεργοποιείς γονιδιακές μεταλλάξεις⁶. Η menin, το προϊόν του γονιδίου MEN1, καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω του μονοπατιού της mTOR δια αναστολής της δραστηριότητας της κινάσης της σερίνης/θρεονίνης AKT1¹⁵². Ως εκ τούτου, οι απενεργοποιείς μεταλλάξεις στο MEN1 καταλήγουν σε ενεργοποίηση της AKT1 και συνεπώς σε άναρχη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό⁴. Τα pNENs είναι πιο επιθετικά από τα άλλα GEP-NENs και αυτό πιθανώς αντικατοπτρίζει το μεταλλακτικό φάσμα τους μια και τα μεταλλαγμένα γονίδια MEN-1, ATRX και DAXX αναγνωρίζονται σε ~50% των αλλοιώσεων. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα γονίδια που συνδέονται με τα κληρονομικά σύνδρομα στα pNENs είναι ογκοκατασταλτικά και κανένα δεν είναι ογκογονίδιο. Ομοίως και στα si-NENs, το μόνο γονίδιο που επιβεβαιώθηκε ως μεταλλαγμένο στα si-NENs (< 10%), το P27^{KIP1}, είναι επίσης ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν κληρονομικοί γενετικοί παράγοντες γνωστοί στα si-NENs ωστόσο, σποραδικές αναφορές οικογενειακών σχέσεων υποδηλώνουν ότι εξακολουθούν να εντοπίζονται γενετικοί παράγοντες¹⁵³.

Όπως σημειώθηκε προηγουμένως, μια κληρονομική μετάλλαξη του MEN1 έχει ως αποτέλεσμα τα pNENs και την ανάπτυξη gNENs, ιδιαίτερα εάν υπάρχουν αυξημένες τροφικές ορμόνες όπως η γαστρίνη (π.χ., στο σύνδρομο Zollinger-Ellison). Είναι αινιγματικό ότι η ίδια κληρονομική μετάλλαξη δεν συσχετίζεται με την σύγχρονη ανάπτυξη si NENs ή NENs σε άλλες εντερικές θέσεις, όμως οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη διεύθυνση του γονιδίου MEN1 είναι άγνωστοι. Τρεις άλλες κληρονομικές διαταραχές γονιδίων NENs περιλαμβάνουν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια της νόσου von Hippel-Lindau (VHL), NF-1, και της οικογενούς οζώδους σκλήρυνσης (TSC).

Αυτόματες σωματικές μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια των MEN1 (~50%), ATRX (18%), DAXX (25%), και mTOR (15%) έχουν ανιχνευθεί¹²⁶. Οι ATRX και DAXX μεταλλάξεις (και οι δυο μαζί στο ~40% των pNENs), σχετίζονται με το στάδιο της νόσου και τις μεταστάσεις και με μειωμένη επιβίωση ελεύθερης νόσου (RFS) και γενικά με μειωμένη επιβίωση σύμφωνα με μερικές μελέτες^{142, 154}. Τα DAXX και ATRX λειτουργούν μαζί ως διμερές, και εμπλέκονται στη σταθεροποίηση της χρωματίνης και οι πρωτεΐνες τους έχουν αποδειχθεί ότι συσχετίζονται ειδικά με περιοχές της τελομερικής χρωματίνης. Η απώλεια των γονιδίων συσχετίζεται με την εναλλακτική επιμήκυνση των τελομερών (ALT), έναν ανεξάρτητο από την τελομεράση μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών¹⁵⁵. Η άναρχη επιμήκυνση των τελομερών μπορεί να οδηγήσει σε απεριόριστο κυτταρική πολλαπλασιασμό των κακοηθών NE κυττάρων. Ενώ όμως προηγούμενα δεδομένα υποδηλώνουν

ότι τα καλά διαφοροποιημένα pNENs με μεταλλάξεις σε MEN1 και DAXX/ATRX τείνουν να έχουν καλύτερη πρόγνωση από εκείνα χωρίς αυτές τις μεταλλάξεις, οι μετέπειτα μελέτες έχουν δείξει ότι η μετάλλαξη/απώλεια DAXX ή ATRX συσχετίζεται με υψηλότερο στάδιο όγκου, μεγαλύτερο μέγεθος όγκου, μεταστάσεις, αντίσταση στη χημειοθεραπεία μειωμένη ειδική του όγκου επιβίωση και γενικά σε κακή πρόγνωση σε pNENs ^{142, 154, 156, 157}.

Η mTOR (mammalian or mechanistic target of rapamycin) είναι μια βασική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην παθογένεση πολλών μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των NENs ¹⁵⁸. Το μονοπάτι της mTOR ρυθμίζει μεταξύ άλλων την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τον μεταβολισμό, την αγγειογένεση και την απόπτωση, ανάμεσα σε άλλες κρίσιμες κυτταρικές λειτουργίες σε απάντηση σε πολλαπλά σήματα ¹⁵⁹. Αυτή η οδός ενισχύεται στα καρκινικά κύτταρα. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις στα mTOR και VEGF/VHL γονίδια τείνουν να έχουν φτωχότερη πρόγνωση. Η χαμηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση της PTEN (phosphatase and tensin homolog protein), ενός αρνητικού ρυθμιστή της οδού PI3K/Akt/mTOR, συνδέεται με σημαντικά μειωμένη επιβίωση σε ασθενείς με pNENs χωρίς μεταστάσεις όπως και διάμεση επιβίωση σε G1/G2 pNENs, ειδικά σε συνδυασμό με αρνητική χρώση για PR (progesterone receptor), ρυθμιζόμενη από το ενεργοποιημένο PI3K/Akt/mTOR μονοπάτι ¹⁶⁰. Τρεις νέοι πιθανοί μηχανισμοί ενεργοποίησης του mTOR έχουν πρόσφατα περιγραφεί από τους Scarpa et al., δηλαδή μεταλλάξεις στα DEPDC5, συγχωνεύσεις ESWR1, και ενίσχυση για το RET υποδοχέα συνδέτη PSPN ¹⁶¹. Τα ευρήματα αυτά, επιβεβαιώνουν τον ρόλο του mTOR μονοπατιού στα pNENs συνεπώς το everolimus, ένας από του στόματος αναστολέας της mTOR θα συνεχίσει να είναι βασικό φάρμακο στην θεραπεία των GEP-NENs. Όμως παρά τις διάφορες προσεγγίσεις και την ενεργό έρευνα στον τομέα αυτό, δεν υπάρχουν προγνωστικοί βιοδείκτες της ανταπόκρισης στην θεραπεία με αναστολείς της mTOR, που να έχουν καθιερωθεί στην κλινική πράξη ⁴. Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις που υποστηρίζουν το ρόλο των CgA και NSE ως προγνωστικών δεικτών με βάση τη συσχέτιση της παρουσίας τους σε NEN όγκους που ανταποκρίνονται σε everolimus ¹⁶²⁻¹⁶⁴. Όμως, δεν συνιστώνται ως χρήση ρουτίνας για την επιλογή ασθενών για θεραπεία με everolimus. Παρ' όλα αυτά, ελπίζουμε ότι μελέτες φάσης II θα αξιολογήσουν τις μεταβολές των μεταβολών του μονοπατιού της mTOR, των κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών κυττάρων και των αγγειογενετικών παραγόντων μετά από θεραπεία με everolimus θα μας δώσουν σημαντικές πληροφορίες σε αυτό το πεδίο ⁴ (Εικ. 36).

Γενικά, η μείωση της ρύθμισης των γονιδίων που σχετίζονται με τη μονοπάτι της mTOR όπως της PTEN και TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2) παρατηρείται στα δύο τρίτα των pNENs και συσχετίζεται με πτωχά αποτελέσματα επιβίωσης ^{165, 166}. Οι γενετικές μεταλλάξεις στο TSC2 προκαλούν μια αυτοσωματική κυρίαρχη διαταραχή που ονομάζεται Οζώδης Σκλήρυνση (TSC) που χαρακτηρίζεται κυρίως από ανεξέλεγκτη ανάπτυξη όγκων μεταξύ των οποίων και pNENs ¹⁶⁷. Άλλες σωματικές μεταλλάξεις όπως η YY1 (T372R) ανευρέθηκαν πιο πρόσφατα σε ~30% των σποραδικών ινσουλινωμάτων ¹⁶⁸ και κλινικά, η μετάλλαξη αυτή έχει συσχετιστεί με αργοπορημένη έναρξη των όγκων ¹⁶⁹.

Οι μελέτες συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού (CGH) στα GEP-NENs, δείχνουν ότι οι χρωμοσωμιακές απώλειες εμφανίζονται συχνότερα από τα κέρδη, ενώ οι γονιδιακές ενισχύσεις είναι ασυνήθιστες ^{170, 171} (Εικ. 38). Ο συνολικός αριθμός των γονιδιωματικών αλλαγών ανά όγκο είναι σχετικές του το μεγέθους του όγκου και του σταδίου της νόσου, υποδεικνύοντας ότι οι γενετικές αλλοιώσεις συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της φυσικής ιστορίας της βλάβης. Έτσι, μεγάλα νεοπλάσματα με αυξημένο κακόηθες δυναμικό και ιδιαίτερα οι μεταστάσεις, τείνουν να φιλοξενούν περισσότερες γενετικές αλλοιώσεις από τα μικρά και κλινικά καλοήθη νεοπλάσματα. Αυτό υποδηλώνει ότι η απώλεια των οδών καταστολής του όγκου και η γονιδιωματική αστάθεια

αντιπροσωπεύουν μηχανισμούς που σχετίζονται με την πρόοδο της νόσου αλλά όχι την έναρξη της, στα pNENs ⁶. Οι απώλειες στα χρωμοσώματα 1 και 11q, καθώς και τα κέρδη στο 9q είναι, ωστόσο, πρώτες εκδηλώσεις επειδή αυτοί έχουν εντοπιστεί σε μικρά νεοπλασμάτα (Εικ. 38).

Επικρατούσες χρωμοσωμιακές αλλαγές συχνές σε μεταστάσεις περιλαμβάνουν, κέρδη και στα δυο χρωμοσώματα 4 και 7 και απώλειες στο 21q, υπονοώντας ότι οι χρωμοσωμιακές ανισορροπίες αυτές μπορεί να συμβάλουν στις μεταστάσεις των pNENs ^{172, 173}.

Ongoing Clinical Trials in GEP-NENs (www.clinicaltrials.gov)			
Identifier	Agent(s)	Trials	Patients
Somatostatin Analogs			
NCT02651987	Lanreotide	CLARINET FORTE: single group, phase II	Well-differentiated metastatic or locally advanced, unresectable panNETs or midgut NETs after progression on a monthly lanreotide regimen.
Somatostatin Analogs Combination			
NCT02795858	SSA + Ramucirumab (anti- VEGFR2)	Single group, phase II	Advanced, progressive carcinoid tumors.
NCT01744249	Octreotide +/- axitinib (tyrosine kinase inhibitor)	Blinded, randomized, phase II	Well differentiated NECs of non-pancreatic origin.
NCT03043664	Lanreotide + Pembrolizumab (anti-PD-L1)	PLANET: phase Ib/II	Non-resectable, recurrent, or metastatic well or moderately differentiated GEP-NENs.
NCT02231762	Lanreotide + temozolomide	SONNET: single group, phase II	Progressive G1/G2 GEP-NENs.
Everolimus-based treatment			
NCT02113800	Everolimus	Single arm, phase II	G3 NECs after failure of first-line platin-based CT.
NCT02687958	Everolimus as maintenance therapy	Randomized, open-label, phase II	Patients with SD, PR or CR after 4–6 cycles of induction CT with cisplatin or carboplatin + etoposide or alternative first-line CT according to local practice.
NCT02031536	Everolimus +/- Placebo	Randomized, double-blind, phase II	panNETs metastatic to the liver with previous surgery.
NCT03049189	¹⁷⁷ Lu-edotreotide vs. everolimus	Randomized, open-label, phase III	Inoperable, progressive, somatostatin receptor-positive (SSTR+) GEP-NENs
Chemotherapy Combinations			
NCT02595424	Cisplatin + etoposide or temozolomide + capecitabine	Open-label, phase II	Unresectable and metastatic gastrointestinal or pancreatic NECs
NCT02246127	Sequence of streptozotocin based chemotherapy and everolimus or vice versa	SEQTOR: open-label, phase II	Advanced progressive panNETs
NCT02358356	¹⁷⁷ Lu-Octreotate + capecitabine and temozolomide (CAPTEM) vs. CAPTEM	CONTROL NETS: open-label, randomized, phase II	Low to intermediate grade panNETs and midgut NENs
NCT01465659	Temozolomide + pazopanib	Single group, phase I/II	Unresectable panNETs
NCT02215447	Nab-paclitaxel + carboplatin	Single group, phase II	Unresectable NECs
NCT02820857	FOLFIRI + bevacizumab vs. FOLFIRI	Open-label, randomized, phase II	Advanced inoperable poorly differentiated NECs of an unknown or GEP origin
NCT02695459	Cisplatin + everolimus	Single group, phase II	Metastatic or unresectable NECs of extrapulmonary origin
NCT02248012	Temozolomide + everolimus	Single group, phase II	First-line treatment in advanced GEP-NECs with a Ki67 of 20–55%
Other targeted therapies			
NCT02678780	Lenvatinib (tyrosine kinase inhibitor)	TALENT: phase II	Advanced/metastatic NENs after progression to a previous targeted agent or GI-NENs after progression to SSA.
NCT02806648	Palbociclib (CDK4/6 inhibitors)	PALBONET: phase II	Well and moderately differentiated metastatic panNETs.
Peptide receptor radiotherapy			
NCT02489604	¹⁷⁷ Lu-DOTATATE 25.9 GBq vs. 18.5 GBq activity	LUNET: randomized, open-label, phase II	G1-G2 GEP-NENs with progressive disease, SSR positive and FDG negative.
Immunotherapy			
NCT02939651	Pembrolizumab	Single group, phase II	Metastatic high-grade NETs who have failed platinum-based CT.
NCT03043664	Pembrolizumab + lanreotide Depot	PLANET: Single group, phase I/II	Non-resectable, recurrent, or metastatic well or moderately differentiated GEP-NENs.
NCT03095274	Tremelimumab (anti-CTLA4) + durvalumab (anti-PD-L1)	DUNE: open label, phase II	Well and moderately differentiated lung carcinoids after progression of other therapies.
NCT02955069	PDR001 (anti-PD-1)	Single group, phase II	G1/G2 GEP-NENs after progression of other treatments. G3 NETs or unknown primary site tumors after progression of Platinum-based CT.
Biomarkers			
NCT02075606	Enumeration of circulating tumor cells to predict clinical symptomatic response and PFS in patients receiving deep subcutaneous administrations of lanreotide	Single group, phase IV:	Functioning midgut NETs
NCT02305810	mTOR pathways alterations, circulating endothelial cells, angiogenic factors correlation with clinical and radiological outcome.	Single group, phase II	Well/moderately differentiated metastatic pancreatic NET treated with everolimus

NENs or NETs neuroendocrine tumors; NECs neuroendocrine carcinomas; panNETs pancreatic NETs; GEP gastro-entero-pancreatic; G1, G2, G3 grade 1, 2, or 3, respectively; CT chemotherapy; PR partial response; CR complete response; FDG fluorodeoxyglucose; PFS progression free survival; TKI tyrosine kinase inhibitor

Εικόνα 37: Συνεχιζόμενες κλινικές μελέτες για GEP-NENs. Από ⁴.

Μοριακά γεγονότα στα si-NENs

Τα si-NENs εμφανίζουν χαμηλότερα ποσοστά των μεταλλάξεων σε σύγκριση με τα pNENs ¹⁷⁴. Τα μεταλλαγμένα γονίδια στα pNENs, NECs και PAC έχει αναφερθεί να είναι wild type στα si-

NENs (π.χ. ATRX, DAXX, KRAS, TP53, TSC1 και TSC2)¹⁷⁴. Ο προσδιορισμός αλληλουχίας του DNA των si-NENs απέτυχε να εντοπίσει μεταλλάξεις στα MEN1, DAXX ή ATRX. Οι σημειακές μεταλλάξεις (μόνο νουκλεοτιδικές παραλλαγές, SNVs) είναι στα si-NENs πάρα πολύ σπάνιες¹⁷⁴ όπως και η MSI, κοινό χαρακτηριστικό όμως των αδενοκαρκινωμάτων του λεπτού εντέρου¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. Μια ανάλυση της MSI σε καλά διαφοροποιημένα si-NENs ή σε μεταστάσεις τους, δεν εντόπισαν στοιχεία MSI. Αντίθετα, τα αδενοκαρκινώματα του λεπτού εντέρου παρουσιάζουν MSI σε ~20% των περιπτώσεων^{179, 180} υποδηλώνοντας ότι τα si-NENs εξελίσσονται διαφορετικά από την επιθηλιακή νεοπλασία σε αυτό το όργανο¹⁷⁸. Τα αδενοκαρκινώματα του λεπτού εντέρου παρουσιάζουν υψηλές συχνότητες ενεργοποιών μεταλλάξεων του BRAF/KRAS, οι οποίες συνήθως απουσιάζουν στα si-NENs¹⁷⁷.

Το χαμηλό βάρος μεταλλάξεων στα si-NENs¹⁷⁴ έρχεται σε αντίθεση με αυτήν που παρατηρείται στους επιθηλιακούς καρκίνους του παχέος εντέρου και του ορθού, υποδεικνύοντας ότι si-NENs είναι ένας από τους πιο γενομικά σταθερούς καρκίνους που έχουν μέχρι τώρα αναλυθεί¹⁸¹⁻¹⁸³.

Σε μια μελέτη με si-NENs εντοπίστηκε χαμηλό ποσοστό παραλλαγών στα σωματικά μονονουκλεοτίδια (με μέσο όρο 0,1 ανά 10⁶ νουκλεοτίδια), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα si-NENs είναι γενικά ήρεμα μεταλλακτικά, αλλά αλλαγές βρέθηκαν στα μονοπάτια της καρκινογένεσης όπως στα PI3K/Akt/mTOR, TGF-β (tumor growth factor β) μέσω μεταβολών στα γονίδια SMAD και SRC¹⁷⁴. Οι Francis et al.¹⁸² επίσης βρήκαν σε si-NENs, συχνές μεταλλάξεις και διαγραφές στο CDKN1B.

Παρόλα αυτά, παρόμοια με τα pNENs, το μονοπάτι της mTOR είναι η πιο συχνά τροποποιημένη οδός σε si-NENs (33%), ένα εύρημα σύμφωνο και με την κλινική ανταπόκριση στο everolimus (αναστολέας της mTOR) σε αυτούς τους ασθενείς. Επιπλέον, διαγραφές και απώλειες χρωμοσωμάτων βρίσκονται σε περισσότερο από το 60% τόσο των οικογενών όσο και των σποραδικών si-NEN, με απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου SMAD4 σε περισσότερο από το 40% των NENs του ειλεού που αναλύθηκαν¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Επίσης τα SNPs που βρίσκονται στον ELK3 (ενός παράγοντα μεταγραφής που υπονοείται στην αγγειογένεση), έχουν βρεθεί σε βλαστικό DNA σε δείγματα αίματος, από ασθενείς με si-NENs, που μπορεί να εξηγήσει τις ανταποκρίσεις σε αντιαγγειογενετικούς παράγοντες στα νεοπλάσματα αυτά¹⁸⁷.

Ο συνδυασμένος προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδιώματος και του εξώματος, η μεθυσίωση και η ανάλυση έκφρασης του RNA, των si-NENs, έχει εντοπίσει ένα διαφορετικό σύνολο γενετικών μεταβολών από εκείνες που παρατηρούνται σε pNENs.

Έτσι οι προσπάθειες που έχουν καταβληθεί για την ανάπτυξη της μοριακής βάσης των si-NENs με σκοπό την καλύτερη ταξινόμηση τους, προσδιόρισαν τρεις ομάδες με διαφορετικά αποτελέσματα¹⁸⁸. Έτσι η πρώτη ομάδα και μεγαλύτερη ομάδα (55-67%) και με την καλύτερη επιβίωση (PFS), παρουσιάζει απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) στο χρωμόσωμα 18 και σχετίζεται με μεταλλάξεις στο CDKN1B (κωδικοποιεί το p27) και αρνητικό CIMP (CpG island methylator phenotype), προτείνοντας ένα λιγότερο επιθετικό φαινότυπο όγκου. Η δεύτερη ομάδα συσχετίστηκε με νεότερη ηλικία έναρξης των όγκων και ενδιάμεση PFS και έδειξε μια υψηλή CIMP θετικότητα και κανένα αντίγραφο CNVs (copy number variations). Η τρίτη ομάδα με την πτωχότερη PFS, είχε πολλαπλές CNVs (LOH Chr18, ενισχύσεις στα χρωμοσώματα 4, 5 και 20)^{182, 188, 189}. Οι ασθενείς με LOH στο χρωμόσωμα 18 και CDKN1B μεταλλάξεις έχουν πιο ευνοϊκή πρόγνωση, ενώ εκείνες με πολλαπλές CNV την χειρότερη πρόγνωση των τριών ομάδων. Ο φαινότυπος ATRX/DAXX/H3.3 chromatin-remodelling pathway-associated ALT phenotype κυριαρχεί σημαντικά στις μεταστάσεις από pNENs (56%) αλλά όχι σε αυτές από NENs του ΓΕΣ (4%), υποστηρίζοντας περαιτέρω τη διαφορά μεταξύ αυτών των ομάδων¹⁵⁵. Μια συνολική λειτουργική επίδραση των μεταβολών στα προαναφερθέντα γονίδια είναι η δυσλειτουργία του κυτταρικού κύκλου μέσω

αλλαγής της δραστηριότητας των cyclin-dependent κινασών ή την κατάργηση της κυτταρικής γήρανσης μέσω της απορρύθμισης στην επιμήκυνση των τελομερών ¹⁴⁴. Επειδή οι 18q και 11q χρωμοσωμιακές απώλειες έχουν υψηλότερη συχνότητα, ενδέχεται να αντανakλούν πρόωρα γεγονότα στην ογκογένεση των si-NENs ¹⁸⁹. Απώλειες στο χρωμόσωμα 16 και κέρδη στο χρωμόσωμα 4 είναι μεταγενέστερα συμβάντα στην ογκογένεση των si-NENs ¹⁹⁰ (Εικ. 38). Οι Lollgen et al. ¹⁸⁶ επιβεβαίωσαν ότι οι 18q διαγραφές είναι χαρακτηριστικό των midgut NENs (ανιχνεύθηκαν στο 88%), ευρήματα που επιβεβαιωθήκαν και πιο πρόσφατα ^{184, 191}.

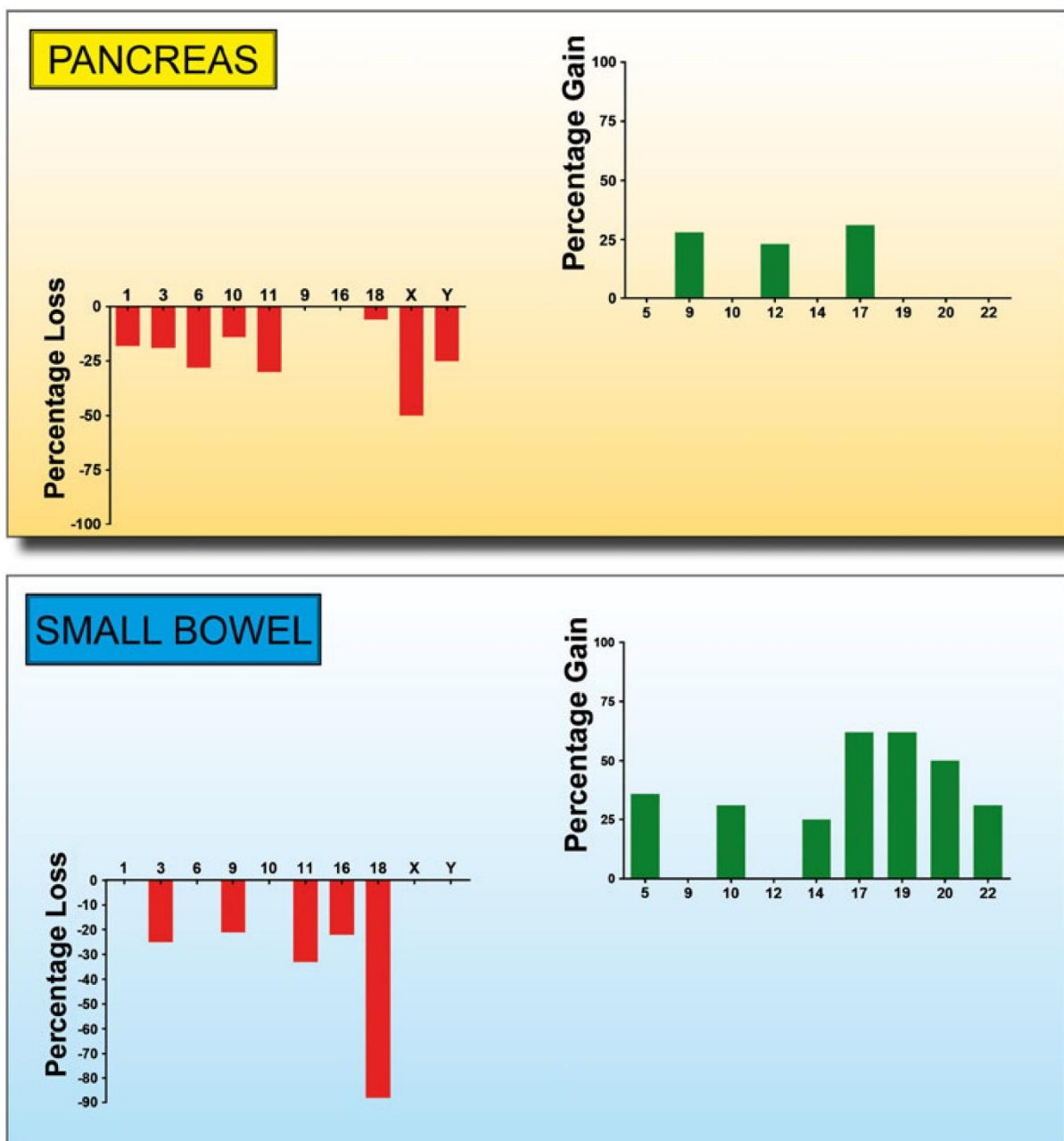
Ένα από τα γονίδια που κωδικοποιούνται στο χρωμόσωμα 18 (18q21) είναι το ογκοκατασταλτικό γονίδιο DCC (που είναι διαγραφμένο στο ορθοκολικό καρκίνωμα). Απώλεια αυτού του γονιδίου, που συνδέεται με το ογκοκατασταλτικό γονίδιο NCAM (μόριο προσκόλλησης νευρικών κυττάρων στο 11q145), πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στη γένεση των NENs ¹⁹².

Μια άλλη CGH μελέτη διαπίστωσε ότι το ~20% των si-NENs εμφανίζει μεταβολές στο απομακρυσμένο τμήμα του 11q (θέση της SDH-D, γονίδιο, SDHD) υποδηλώνοντας ότι οι αλλαγές σε αυτό το γονίδιο μπορεί να εμπλέκεται στην ογκογένεση των si-NENs ¹⁹⁰.

Στα si-NENs, τα menin ή P27 αρνητικά νεοπλάσματα (σε αντίθεση με τα menin/P27-διπλά θετικά) συσχετίστηκαν με έναν υψηλότερο grade ³, λεμφαδενικές μεταστάσεις και πιο προχωρημένο στάδιο ⁶. Η απώλεια του P27 συσχετίστηκε σημαντικά με μειωμένη επιβίωση και ήταν ένας ανεξάρτητος παράγοντας κακής συνολική επιβίωσης ⁶. Το P27 εμπλέκεται στο σύνδρομο MEN4 ¹⁹³ και ρυθμίζεται μεταγραφικά από το menin ¹⁹⁴, υποδηλώνοντας ότι η μηχανιστική βάση για τα pNENs και si-NENs μπορεί να είναι συζευγμένη σε μοριακό επίπεδο ⁶.

Κληρονομική προδιάθεση για si-NEN δεν έχει ακόμα δημοσιευθεί. Ωστόσο, οικογένειες που έχουν πολλούς συγγενείς με την ασθένεια (π.χ., βλέπε <https://clinicaltrials.gov/show/NCT00646022>) έχουν προσδιοριστεί, και τα υποψήφια γονίδια σε αυτές τις οικογένειες είναι υπό διερεύνηση. Οι γενετικές αναλύσεις μιας οικογένειας με τρεις συνεχείς συγγενείς πρώτου βαθμού δεν κατάφεραν να εντοπίσουν κληρονομική προδιάθεση για MEN-1 ¹⁵³. Παρόμοιες μελέτες ^{195, 196} δείχνουν ότι το γονίδιο menin δεν συνδέεται με κληρονομικά si-NENs. Πρόσθετη υποστήριξη για έναν κληρονομικό παράγοντα στα si-NENs, υπήρξε από οικογενειακές μελέτες για τον καρκίνο, και εντοπίστηκε αυξημένος κίνδυνος για si-NENs στους απογόνους ασθενών με καρκίνο δέρματος (πλακώδες) (RR 1,79), non Hodgkin λέμφωμα (RR 2,06) και καρκίνο του ενδομητρίου (RR 2,21) ¹²⁷. Τα παιδιά ασθενών με si-NENs έχουν αυξημένο κίνδυνο για καρκίνου του μαστού (RR 1,39), νεφρών (RR 2,08) και εγκεφάλου (RR 1,65). Αυτές και άλλα επιδημιολογικές μελέτες ^{127, 129} έχουν δείξει ότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης si-NENs σε άτομα που έχουν γονική ιστορία της νόσου, και μια οικογένεια με ιστορικό οποιουδήποτε καρκίνου (δηλαδή όχι μόνο NEN) αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη αυτών των νεοπλασιών ¹⁹⁷. Οι μεταλλάξεις που συνδέονται με την ανάπτυξη si-NENs είναι άγνωστες.

³ Grade = ιστολογική βαθμονόμηση ή διαβάθμιση



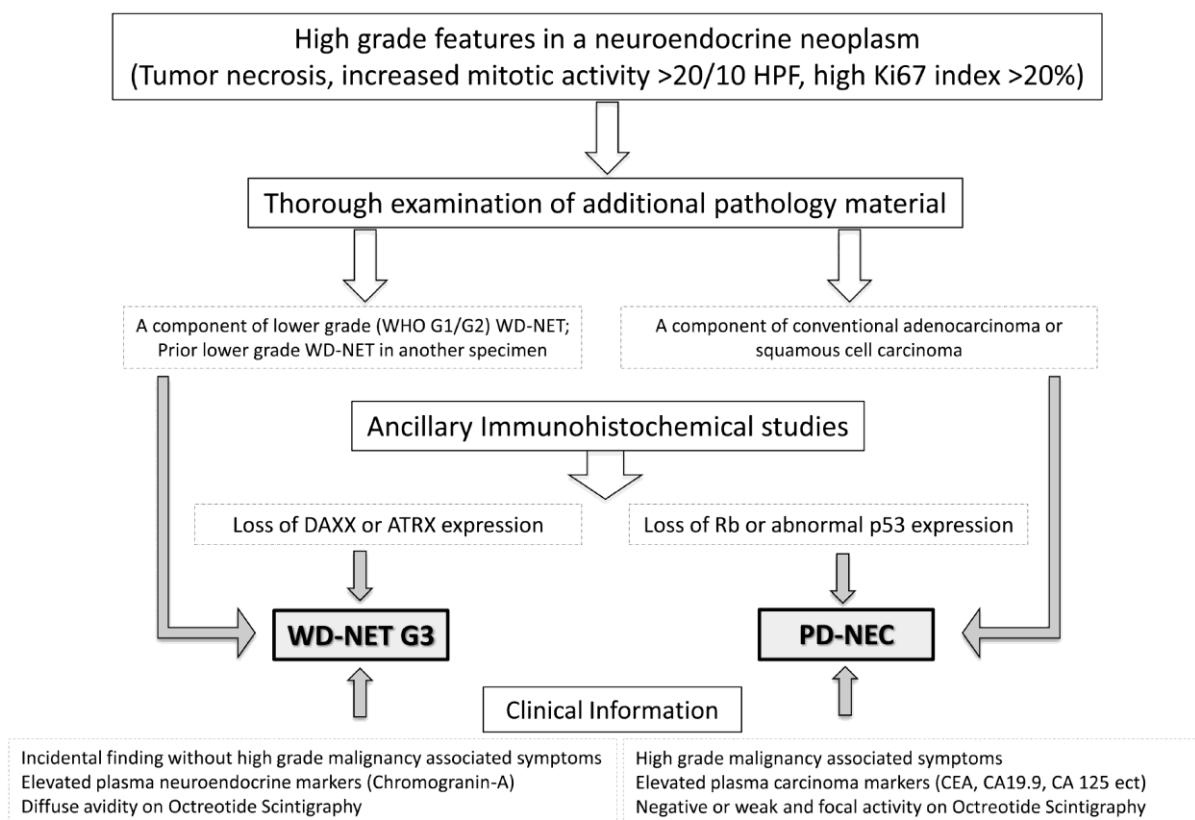
Εικόνα 38: Χρωμοσωμιακές ανωμαλίες που εντοπίστηκαν στα GEP-NENs. Σε pNETs (άνω), οι συνηθέστερες απώλειες εμφανίζονται στα χρωμοσώματα 6, 11, X και Y. Τα συχνότερα κέρδη περιλαμβάνουν τα χρωμοσώματα 9, 12 και 17. Σε si-NENs (κάτω), η συνηθέστερη απώλεια είναι στα 18, ενώ τα 17 και 19 παρουσιάζουν τα πιο κοινά κέρδη. Είναι προφανές ότι τα pNENs και τα si-NENs NET εκφράζουν σημαντικά διαφορετικά πρότυπα χρωμοσωματικών αναδιαρθρώσεων, ωστόσο, οι ακριβείς συνέπειες των αλλαγών δεν έχουν ακόμη επιλυθεί. Από ¹.

Μοριακά γεγονότα στα Neuroendocrine Carcinomas

Τα GEP-NECs είναι το 6-25% όλων των GEP-NENs με μια κυμαινομένη συχνότητα με την πάροδο του χρόνου ¹⁹⁸. Η αλληλουχία του γονιδιώματος, η στοχοθετημένη αλληλουχία του εξώματος και η ανοσοϊστοχημική ανάλυση των pNECs έχουν δείξει αδρανοποιές μεταλλάξεις των γονιδίων TP53 και RB1 και μη φυσιολογική έκφραση των πρωτεϊνικών τους προϊόντων ^{199, 200}. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 και των μεταλλάξεων KRAS έχει παρατηρηθεί σε 70% έως 80%

των NECs ¹⁹⁹. Πρόσφατα προτάθηκε ένας διαγνωστικός αλγόριθμος που προσθέτει τις γενετικές πληροφορίες στα συμβατικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των NECs με βάση το εύρημα της απενεργοποίησης των DAXX/ATRX σε καλά διαφοροποιημένα G3-NETs και μεταβολές στην έκφραση των RB1 και TP53 σε κακώς διαφοροποιημένα NECs ²⁰¹ (Εικ. 39). Ακόμα μέσα από μερικές μελέτες αναδείχθηκε ότι οι μεταλλάξεις του BRAF (V600E και G593S) ανιχνεύονται στο 9% των NECs ^{202, 203} και μερικοί ασθενείς με την BRAF V600E μπορεί να ανταποκριθούν στην συνδυασμένη θεραπεία με BRAF-MEK (Dabrafenib και trametinib) ²⁰⁴, αναδεικνύοντας έτσι ένα νέο ρόλο για το BRAF ως βιοδείκτης και φαρμακευτικός στόχος στα NECs ²⁰³ (Εικ. 40). Οι εικόνες 40, 41 συνοψίζουν τις κυρίαρχες μοριακές αλλοιώσεις στα GEP-NENs και NECs.

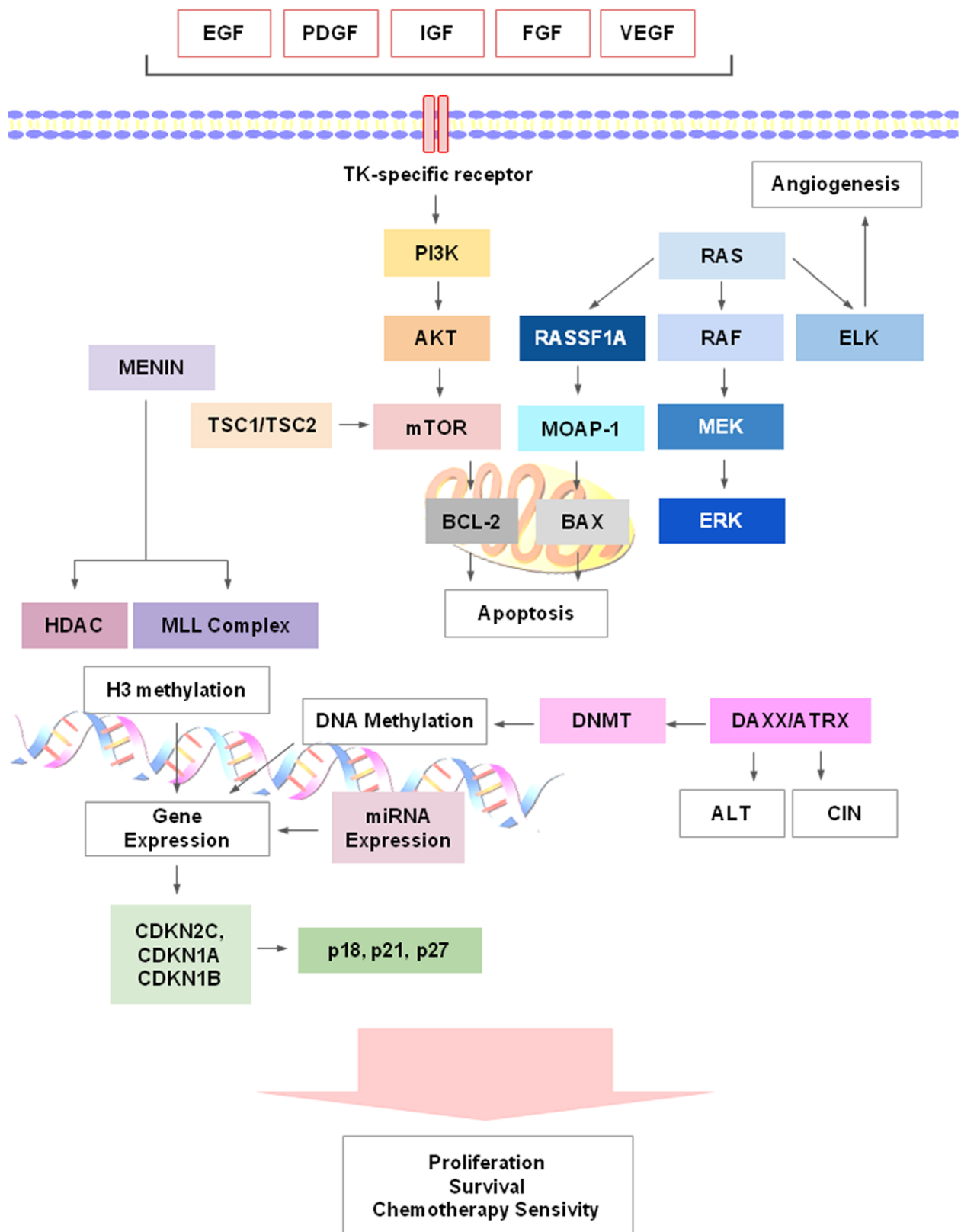
Όπως και με το PAC, τα GEP NENs, εμφανίζονται να προέρχονται από διαφορετική πορεία καρκινογένεσης από τα κακώς διαφοροποιημένα NECs και MiNENs (former MANECs) ^{175, 199, 205-208}. Οι τελευταίες δύο ομάδες όγκων είναι παρόμοιες με τα αδενοκαρκινώματα στην εμφάνιση μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) και TP53, KRAS, APC, BRAF και RB ^{205-207, 209-211}. Οι μεταλλάξεις DAXX/ATRX δεν συμβαίνουν σε κακώς διαφοροποιημένες NECs ¹⁹⁹. Σημειώνεται ότι οι Sahnane et al. έδειξαν ότι τα NECs και MiNENs με δορυφορική αστάθεια (MSI unstable) είχαν σημαντικά βελτιωμένη επιβίωση (διάμεση επιβίωση 60 μήνες έναντι 5,5 μήνες) σε σύγκριση με MSI σταθερούς όγκους ²¹⁰.



Εικόνα 39: Συνιστώμενος διαγνωστικός αλγόριθμος για G3 pNETs. Από ²⁰¹

Pancreatic NETs	Enteric NETs	NEC
Mutations in: <i>ATRX</i> <i>MEN1</i> <i>ASCL1</i> <i>TP53</i> <i>mTOR</i> <i>ARID1A</i> <i>VHL</i> 20%. <i>KRAS</i> <i>SMAD4/DPC</i> <i>TP53</i> <i>VHL</i> <i>MUTYH</i> <i>CHEK2</i> <i>BRCA2</i> <i>APOBEC3A-3B</i> <i>BRCA</i> deficiency Inactivation: <i>MEN1</i> <i>SETD2</i> <i>ARID1A</i> <i>MLL3</i> <i>CDKN2A</i> promoter Higher expression: Histones H2A and H2B MiR-196a CIMP phenotype	<u>Small intestinal NET</u> Chromosome 18 loss of heterozygosity (LOH) Mutations in: <i>CDKN1B</i> <i>ABCC12</i> <i>BRAF</i> <i>EZH2</i> <i>FANCD2</i> <i>FGFR2</i> <i>MEN1</i> <i>VHL</i> CIMP phenotype <u>Mutations in Colorectal NET</u> <i>BRAF</i> V600E <i>BRAF</i> G593S	Inactivation: <i>TP53</i> <i>RB1</i> <i>CNBD1</i> Activation mutations: <i>KRAS</i> <i>BRAF</i> V600E <i>BRAF</i> G593S Overexpression of Bcl-2

Εικόνα 40: Οι κυρίαρχες μοριακές μεταβολές στα GEP-NETs και NECs (σπάνιες μεταλλάξεις εμφανίζονται με γκρι). Από ⁴.



Εικόνα 41: Βασικά μοριακά ευρήματα σε NENs, πιθανές κυτταρικές διεργασίες και πιθανές εφαρμογές. EGF = epidermal growth factor. PDGF = platelet derived growth factor. IGF = insulin growth factor. FGF = fibroblast growth factor. VEGF = vascular endothelial growth factor. TK = tyrosine kinase. PI3K = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase. TSC1 and 2 = Tuberous Sclerosis Complex 1 and 2. mTOR = mammalian target of rapamycin. BCL-2 = B-cell lymphoma 2. BAX = Bcl-2-associated X protein. RASSF1A = Ras-association domain gene family 1 tumor suppressor

gene. MLL complex = mixed lineage leukemia. HDAC = histone deacetylases. DNMT = DNA methyltransferases. ALT = alternative lengthening of telomeres. CIN = chromosomal instability. Από 4.

Μεταστάσεις

Η μεταστατική νόσος στα NENs παραμένει ένα αίνιγμα, παρά το γεγονός ότι η πλειοψηφία των GEP-NENs έχουν μεταστάσεις όταν διαγιγνώσκονται⁸⁷. Δεν είναι σαφές γιατί σε σχεδόν πλήρη απουσία γνωστών καρκινογόνων μεταλλάξεων, καθώς και με σχετικά χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας των όγκων (> 60% των si-NENs είναι low grade (< 2% Ki67)), οι περισσότεροι όγκοι είναι μεταστατικοί.

Η απόδειξη για αυτό βασίζεται σε μια σειρά επιδημιολογικών μελετών. Τυπικά, το 12% των GEP-NENs <10 mm έχουν ήδη μεταστάσεις κατά τη στιγμή της διάγνωσης, και το 60% των βλαβών <20 mm έχουν επίσης μεταστάσεις²¹². Αυτό είναι ιδιαίτερα σχετικά στα si-NENs και τα NENs του παχέος εντέρου όπου το 90% είναι ήδη μεταστατικά σε μέγεθος 20 mm. Είναι αξιοσημείωτο είναι ότι το 72% των si-NENs είναι ήδη μεταστατικά όταν η πρωτοπαθής εστία έχει μέγεθος μόνο 10 mm²¹². Έτσι, η μετάσταση εμφανίζεται παρά την "ραθυμία" της νόσου, όμως δεν αντανakλάται στην επιβίωση (δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην επιβίωση μεταξύ τοπικής και μεταστατικής νόσου (ολιγομεταστατική) στα si-NENs (94% και 80%, αντίστοιχα)²¹². Η από μακρού αποδεκτή παραδοχή ότι υπάρχει μια άμεση σχέση μεταξύ του μεγέθους και της ανάπτυξη των μεταστάσεων δεν φαίνεται ότι ισχύει για τα GEP-NENs.

Επί του παρόντος, οι βασικοί μηχανισμοί που οδηγούν τις μεταστάσεις (όπως εκείνες που οδηγούν την ογκογένεση στα NENs) παραμένουν ασαφείς, ωστόσο, δύο γονίδια, τα ATM (Ataxia telangiectasia mutated kinase) και MTA1 (Metastasis-associated 1), έχουν ενοχοποιηθεί⁶. Η ATM αρνητικότητα συσχετίστηκε με μεταστάσεις και σημαντικά μειωμένη συνολική επιβίωση ενώ υψηλά επίπεδα ATM mRNA συσχετίζονται με υπερέκφραση της ATM πρωτεΐνης με ανοσοϊστοχημεία, και χαμηλά ποσοστά πολλαπλασιασμού, μικρότερους όγκους, χαμηλότερα ποσοστά υποτροπής και καλά διαφοροποιημένους όγκους^{213, 214}.

Συνολικά, η ελάττωση της ρύθμισης του ATM (down-regulation) συσχετίστηκε με μεταστάσεις²¹³. Ο μηχανισμός, ωστόσο, φαίνεται να διαφέρει από την μη νευροενδοκρινική νεοπλασία όπως π.χ., ο καρκίνος του μαστού, όπου η υπερδραστηριότητα και όχι η απώλεια δραστηριότητας συνδέονται με μεταστάσεις²¹⁵.

Το γονίδιο MTA1 παίζει ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA, στη φλεγμονή, και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις²¹⁶. Το MTA1 υπερεκφράζεται στην πλειοψηφία (> 95%) των si-NENs, υποδηλώνοντας ότι αυτό το γονίδιο μπορεί να ενεργοποιήσει τις μοριακές οδούς που προάγουν την πρόοδο του όγκου και τις μεταστάσεις²¹⁷.

Μαθηματικά μοντέλα καταδεικνύουν ότι τα επίπεδα έκφρασης στο όγκο του mRNA του MTA1 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη μεταστάσεων με 100% ευαισθησία και ειδικότητα²¹⁸.

Το μεταγραφικό προφίλ των GEP-NENs (Transcriptional Profiling)

Τα μεταγραφικά προφίλ τόσο των pNENs όσο και των si-NENs χαρακτηρίζονται από μη αλληλεπικαλυπτόμενη έκφραση μεταγραφών τόσο μεταξύ τους όσο και εντός κάθε ομάδας όγκων (ετερογένεια έκφρασης). Τα pNENs εκφράζουν μια σειρά γονιδίων συμπεριλαμβανομένου του ANG2 (υπερεκφράζεται στο 89%)²¹⁹. Επιπλέον, η σηματοδότηση της πρωτεΐνης του αμυλοειδούς των νησιδίων και της καλσιτονίνης ήταν δύο οδοί που εκφράζονται. Πολλά άλλα γονίδια υπερεκφράζονται και συσχετίζονται με διαφορετικές βιολογικές συμπεριφορές και στα pNENs και

si-NENs και ελπίζουμε ότι αυτές οι αναλύσεις θα μας δώσουν τέτοια στοιχεία στο μέλλον που θα μπορέσουμε να τα χρησιμοποιήσουμε στην πρόγνωση και θεραπεία των GEP-NENs⁶

Η επιγενετική των GEP-NENs

Οι γενετικές αλλαγές που συνδέονται με τα οικογενειακά κληρονομικά σύνδρομα (MEN1, VHL, NF-1 και TSC κλπ.) έχουν καθοριστεί καλά, ωστόσο, το γενετικό προφίλ των σποραδικών όγκων είναι λιγότερο σαφές και η ογκογένεση τους δεν φαίνεται να ελέγχεται από κλασικά ογκογονίδια όπως τα P53, RB ή KRAS²²⁰⁻²²² όπως είναι γνωστό. Ακόμη και στα GEP-NENs, δεν υπάρχουν κοινά ογκογόνα προγράμματα οδήγησης, για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις των DAXX/ATRX εμπλέκονται έντονα στην ογκογένεση των pNENs, αλλά όχι των si-NENs.

Κατά συνέπεια, η δυσλειτουργία των επιγενετικών μηχανισμών έχει υποτεθεί ως ένας πιθανός ρυθμιστής της ογκογένεσης των GEP-NENs και έχει γίνει επίκεντρο πρόσφατων μελετών. Η επιγενετική είναι η μελέτη των κληρονομικών τροποποιήσεων που ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση χωρίς μεταβολές στην ίδια την αλληλουχία του DNA του γονιδίου²²³. Παρέχει ένα βαθύτερο επίπεδο της κατανόησης των φαινοτυπικών αλλαγών απουσία αλλαγών στην κλασική γενετική.

Παρά την ετερογένεια των GEP-NENs, είναι προφανές ότι υπάρχουν πρότυπα μεθυλίωσης, αλλοιώσεις αναδιαμόρφωσης χρωματίνης και προφίλς διαφορικής αποκωδικοποίησης του microRNA και του long non-coding RNA (lncRNA), τα οποία είναι ειδικά των GEP-NENs, και μερικά από τα οποία συσχετίζονται με σημαντικές διαφορές σε κλινικά αποτελέσματα.

Πρόσφατες μελέτες έχουν εντοπίσει βασικές μοριακές οδούς, όπως ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR, δευτερογενώς μετά από την ρύθμιση προς τα κάτω των PTEN και TSC2 σε σποραδικά NENs¹⁶⁵, γεγονός που οδήγησε στην κλινική επιτυχία του στοχευμένου αναστολέα της mTOR, everolimus, για μεταστατικά NENs²²⁴. Όμως η έλλειψη πλήρους απόκρισης για όλους τους ασθενείς υποδηλώνει ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στον κακοήγη μετασχηματισμό, είτε με αλλοίωση άλλων οδών μεταγωγής σήματος είτε με δυσλειτουργία στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης. Περαιτέρω διερεύνηση των σποραδικών pNENs αποκάλυψε γενετικές μεταβολές στα γονίδια MEN1 και DAXX/ATRX, οι οποίες αλλοιώνουν τη δράση της μεθυλοτρανσφεράσης της ιστόνης και την σταθεροποίηση της χρωματίνης, αντίστοιχα¹⁴². Αυτά τα ευρήματα παρέχουν μια σύνδεση μεταξύ των γονιδιωματικών μεταβολών και του ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης και έτσι έχουν προκαλέσει περαιτέρω διερεύνηση της επιγενετικής ρύθμισης των νευροενδοκρινικών όγκων.

Επιγενετικοί μηχανισμοί

Η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών είναι οι κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται σε όλους τους καρκίνους²²⁵ (Εικ. 42). Ίσως ο πιο καλά κατανοητός επιγενετικός μηχανισμός είναι η μεθυλίωση του DNA²²⁶. Γενικά, η μεθυλίωση έχει σταθεροποιητική επίδραση στην κυτταρική λειτουργία. Στην ανάπτυξη του καρκίνου, τα πρότυπα μεθυλίωσης είναι ειδικά για τον ιστό και το χρωμόσωμα, με την υπομεθυλίωση να έχει συσχετιστεί με τη χρωμοσωμιακή αστάθεια, την επανενεργοποίηση στοιχείων μεταφοράς και την απώλεια αποτύπωσης, ενώ η υπερμεθυλίωση σχετίζεται με την αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων²²⁷.

Μια άλλη επιγενετική αλλαγή που παρατηρείται συχνά είναι η τροποποίηση των ιστονών. Οι ιστόνες, είναι πρωτεΐνες, που αποτελούν το κύριο συστατικό της χρωματίνης και σχηματίζουν τον σκελετό των νουκλεοσωμάτων για την συσκευασία του DNA. Οι τροποποιήσεις στη δομή τους, συμβάλλουν στην επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, συμπεριλαμβανομένης της ακετυλίωσης, της μεθυλίωσης και της φωσφορυλίωσης. Το ακριβές ρυθμιστικό αποτέλεσμα εξαρτάται από τον τύπο της χημικής τροποποίησης, δηλαδή π.χ., άλλο το αποτέλεσμα της

μεθυλίωσης και άλλο της ακετυλίωσης. Συνεπώς, η τροποποίηση των συστατικών της συσκευασίας του DNA είναι κρίσιμη για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, η οποία εναλλάσσεται από ετεροχρωματίνη (σφιχτά συσκευασμένες, μεταγραφικά σιωπηλές μορφές) σε ευχρωματίνη (λιγότερο συμπυκνωμένες, μεταγραφικά δραστικές μορφές) ²²⁸.

Τέλος, τα μη κωδικοποιητικά RNAs (non-coding RNAs) παίζουν επίσης ρόλο σε επιγενετικές αλλαγές. Τα μη κωδικοποιητικά RNAs αντιπροσωπεύουν το 98% του μεταγεγραμμένου γονιδιώματος, αλλά δεν υποβάλλονται σε μεταγενέστερη μετάφραση ²²⁹. Δηλαδή για να το καταλάβουμε απλά, ένα μη κωδικοποιητικό RNA (ncRNA) είναι ένα λειτουργικό μόριο RNA το οποίο μεταγράφεται από το DNA αλλά δεν μεταφράζεται σε πρωτεΐνες. Τα σχετιζόμενα με την επιγενετική ncRNAs περιλαμβάνουν miRNAs (<200 νουκλεοτίδια), siRNAs, piRNAs και lncRNAs (> 200 νουκλεοτίδια). Όμως αυτά, λειτουργούν ως τροποποιητές προ- και μετά-μεταφράσεως και τους έχει δοθεί ιδιαίτερη πρόσφατη προσοχή ως έχοντα ρυθμιστικούς ρόλους τόσο στη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη όσο και στην ογκογένεση ²²⁸.

Τα lncRNAs έχουν εμπλακεί ως βιοδείκτες στον καρκίνο του προστάτη, το ηπατοκυτταρικό και μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνωμα ^{230, 231}. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι εμπλέκονται στη γονιδιακή ρύθμιση σε μεταγραφικά, μεταφραστικά και μετά-μεταφραστικά επίπεδα ²³¹. Από την άλλη πλευρά, τα miRNAs φαίνεται να έχουν κυρίως μετά-μεταγραφικό ρόλο. Η υπέρ- και υποέκφραση διαφόρων miRNAs έχουν εμπλακεί σε σχεδόν όλους τους συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του μαστού, του τραχήλου της μήτρας, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του προστάτη, του παγκρέατος και του θυρεοειδούς ²³².

Τεχνικές όπως ο προσδιορισμός της διθειώδους αλληλουχίας για τη μεθυλίωση του DNA, και η ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης (ChIP), η τεχνολογία μικροσυστοιχιών (microarray) και η Next Generation Sequencing (NGS), επέτρεψαν σημαντικές επιγενετικές ανακαλύψεις σε διάφορους όγκους συμπεριλαμβανομένων του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου (MDS) και του δερματικού Τ λεμφώματος. Συγκεκριμένα, υπάρχουν σήμερα τέσσερα φάρμακα εγκεκριμένα από την FDA που έχουν επιγενετικό μηχανισμό δράσης: η 5-αζακυτιδίνη και η δεσιταβίνη (αναστολείς DNMT), στη θεραπεία μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου υψηλού κινδύνου ^{233, 234} και το υποεραλανιλίδιο του υδροξαμικού οξέος (vorinostat) και η ριμιδεψίνη (histone acetyltransferases και deacetylases (HDAC) αναστολείς) στο δερματικό Τ λέμφωμα ^{235, 236}. Επιπλέον, υπήρξαν ελπιδοφόρα προκαταρκτικά δεδομένα in vivo με τη χρήση miRNAs για τη βελτίωση της επιβίωσης στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ²³⁷.

Συνολικά, αυτές οι εξελίξεις έχουν αποδείξει την κλινική αξία της χρήσης επιγενετικών τροποποιήσεων όχι μόνο ως ογκολογικών βιοδεικτών, αλλά και ως δυνητικοί θεραπευτικοί στόχοι. Συνεπώς, οι τρέχουσες μελέτες διερευνούν τους επιγενετικούς μηχανισμούς που μπορούν να συμβάλουν στην ογκογένεση των GEP-NENs και ελπίζουμε ότι αυτές οι εξελίξεις θα χρησιμεύσουν ως βάση για μελλοντικές θεραπευτικές εξελίξεις.

Mechanism	Effect	Regulation	Ref.
DNA Methylation		DNMTs	
Hypomethylation	Chromosomal instability, reactivation of transposable elements, loss of imprinting		[12]
Hypermethylation	Inactivation of tumor suppressor genes		[12]
Histone modification		HDACs, histone methyltransferases	
Lysine acetylation	Transcription activation		[12]
Methylation	Transcription activation or suppression		[12]
Noncoding RNAs		Variable	
LncRNAs	Pre-transcriptional regulation		[17]
MiRNAs	Post-transcriptional binding to 3'-untranslated regions to inhibit translation or promote mRNA degradation		[18]

DNMTs: DNA methyltransferase enzymes; HDACs: Histone acetyltransferases and deacetylases; LncRNA: Long non-coding RNA.

Εικόνα 42: Επισκόπηση των επιγενετικών μηχανισμών σε καρκίνο. Ref 12²²⁷, 17²³⁸, 18²³¹. Από²²²

Η τρέχουσα θέση της επιγενετικής στα NENs

Η μενίνη παίζει κεντρικό ρόλο στα pNENs ρυθμίζοντας την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, την επιδιόρθωση του DNA και τη γήρανση. Η μενίνη είναι μέρος του συμπλέγματος MLL/SET1-like histone methyltransferase και αλληλοεπιδρά με διάφορες αποακετυλάσες ιστονών (HDACs)²³⁹⁻²⁴². Η επιμήκυνση και η σταθεροποίηση των τελομερών απαιτούνται για την επιβίωση και την αθανασία των κυττάρων του όγκου²⁴³. Η μενίνη καταστέλλει το ένζυμο τελομεράση και μπορεί να ανταποκρίνεται σε βλάβες του DNA για την γονιδιωματική σταθερότητα με ενεργοποίηση της μεταγραφής πρωτεϊνών γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA (π.χ. BRCA1 και RAD51)^{244, 245}.

Το σώμα των στοιχείων που υποστηρίζουν το ρόλο της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και της αποκατάστασης του DNA στην παθογένεση των NENs συνεχίζεται με την ανεύρεση νέων μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν την ιστόνη μεθυλοτρανσφεράση SETD2, τις απομεθυλάσες ιστόνης UTX και JARID1C^{246, 247}, και πιο πρόσφατα στο MUTYH και το CHEK2, γονίδια επιδιόρθωσης εκτομή-βάσης που ανευρέθησαν σε σύνδρομο πολυποδίασης του παχέος εντέρου και στον καρκίνο του μαστού, αντίστοιχα¹⁶¹.

Τα προφίλς μεθυλίωσης των υποψήφιων γονιδίων στα GEP-NENs έχουν μελετηθεί εκτενώς. Υπάρχουν δεδομένα που υποδηλώνουν ότι αυτά τα προφίλς είναι τελείως διαφορετικά μεταξύ των pNENs και των άλλων GEP-NENs και μερικά από αυτά φαίνονται στην εικόνα 43²²² (Εικ. 43).

Μία από τις αρχικές μελέτες για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης έγινε από τους Jiao et al.¹⁴² όπου με exome sequencing σε pNENs και εντοπίστηκαν μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση χρωματίνης. Τα κύρια γονίδια που ευρέθησαν μεταλλάξεις ήταν τα MEN1 (44%), DAXX (25%), και ATRX (18%) που έχουν αναγνωρισμένο εξέχοντα ρόλο στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, και μας δίνουν έναν σύνδεσμο μεταξύ της μεθυλίωσης του DNA και τροποποιήσεων των ιστονών. Είναι ενδιαφέρον ότι σύμφωνα με αυτήν την μελέτη, οι ασθενείς με μεταλλάξεις στα MEN1, DAXX/ATRX, ή σε έναν συνδυασμό τους είχαν βελτιωμένη επιβίωση σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν μετάλλαξη, ιδιαίτερα σε εκείνους με μεταστατική νόσο¹⁴² αλλά στις επόμενες μελέτες τα πράγματα ήταν λίγο διαφορετικά μια και οι μεταλλάξεις αυτές συνδέθηκαν με μειωμένη επιβίωση^{154, 222, 248, 249}. Αυτές οι αποκλίσεις οφείλονται πιθανώς σε σφάλμα επιλογής (διαφορετικά ποσοστά μεταστατικής νόσου στις διάφορες μελέτες), όμως περισσότερη αξία έχει να καταλάβουμε ότι η απώλεια έκφρασης DAXX/ATRX αναγνωρίζει μόνο ένα υποσύνολο των pNENs, και ίσως οι αλλαγές αυτές έχουν διαφορετικό ρόλο ανάλογα με το στάδιο της νόσου²²². Τα στοιχεία αυτά επιβεβαιώθηκαν οριστικά σε μια μεγαλύτερη σειρά αξιολόγησης της ALT θετικότητας (alternative lengthening of telomeres ,ALT) με telomere-specific FISH (Fluorescence in situ hybridization), και απώλειας DAXX/ATRX σε pNENs¹⁵⁶. Στην μελέτη αυτή, οι Singhi et al.¹⁵⁶ αλλά και σε άλλες μελέτες^{154, 249}, έδειξαν ότι η ALT θετικότητα και η απώλεια DAXX/ATRX σχετίζονται με επιθετικά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και χειρότερη επιβίωση χωρίς νόσο (DFS), αλλά όχι απαραίτητα επιβίωση ειδική της νόσου (DSS).

Ένα άλλο γονίδιο με ενδιαφέρον στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στα GEP-NENs είναι το NAP1L1 (nucleosome assembly protein 1-like 1²⁵⁰⁻²⁵³).

Οι επιγενετικές αλλαγές στον si-NENs συνδέονται με μεταστατική νόσο⁴. Έτσι τα επίπεδα μεθυλίωσης του RASSF1 και CTNNB1 (το γονίδιο της β-catenin) είναι υψηλότερα σε μεταστατικά si-NENs, σε σχέση με τα πρωτοπαθή si-NENs²⁵⁴ και τα προφίλς του miRNA είναι διαφορετικά στα διάφορα στάδια της νόσου^{255, 256}. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι η μεθυλίωση και η

απορρύθμιση του miRNA παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της μεταστατικής νόσου και τονίζουν τη σημασία τους ως προγνωστικοί και θεραπευτικοί στόχοι στα si-NENs.

Έτσι οι προσπάθειες που έχουν καταβληθεί για την ανάπτυξη της μοριακής βάσης των si-NENs με σκοπό την καλύτερη ταξινόμηση τους, προσδιόρισαν τρεις ομάδες με διαφορετικά αποτελέσματα¹⁸⁸ όπως νωρίτερα αναφέραμε. Και άλλες προσπάθειες τέτοιας ταξινόμησης έχουν γίνει²⁵⁷⁻²⁶⁶, όπου εμπλέκονται μοριακά προϊόντα και γονίδια όπως τα FOXM1, TGFβ1, PTGER2, NUPR1, αλλά θεωρείτε ότι είναι πολύ πρώιμα τα συμπεράσματα αυτών των ταξινομήσεων των si-NENs βάσει του μοριακού τους προφίλ και απαιτείται χρόνος και μεγαλύτερες μελέτες για να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα και όσον αφορά την προγνωστική αξία των βιοδεικτών αυτών αλλά και την φαρμακευτική χρήση διαφόρων ανταγωνιστών⁴.

Οι επιγενετικές αυτές μελέτες αναδεικνύουν την επικάλυψη και πολυπλοκότητα των επιγενετικών τροποποιήσεων, και ενώ οι πρόσφατες μελέτες μας παρέχουν ένα σημαντικό βήμα για την προώθηση της κατανόηση της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης στα pNENs και την χρησιμότητα τους ως πιθανοί προγνωστικοί βιοδείκτες, όμως οι μηχανισμοί με τους οποίους οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν την επιβίωση σε κυτταρικό επίπεδο δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί καλά²²².

Modification	Gene	Gene function	Clinical effect	Tumor
Hypermethylation (Inactivation)	<i>RASSF1</i>	Induces cell cycle arrest	Correlated with malignancy, levels highest in metastases	PNET > GI-NET
	<i>INK4a/p16</i>	Induces cell cycle arrest and apoptosis	Decreased 5-yr survival, liver metastases	PNET, gastrinoma
	<i>MGMT</i>	DNA repair	Improved response to temozolomide	PNET
	<i>TIMP-3</i>	Inhibits metalloproteinases	Correlated with metastases	PNET
	<i>UCHL-1</i>	Post-translational modifier, de-ubiquitinates proteins marked for lysosomal degradation	Correlated with metastases	GEP-NET
	<i>IGF2</i>	Chromatin packaging	Specific for insulinomas, increased stage	Insulinoma
	<i>MLH1</i>	DNA repair	Correlated with malignancy	PNET, insulinoma
Global hypomethylation	<i>LINE-1</i>	Repeating long interspersed nucleotide elements	Correlated with malignancy and lymph node metastases	Ileal NET > GEP-NET
	<i>Alu</i>	Repeating long interspersed nucleotide elements	Correlated with malignancy	GEP-NET

GEP-NETs: Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors; PNETs: Pancreatic tumors; GI-NETs: Gastrointestinal tumors.

Εικόνα 43: Προφίλς μεθυλίωσης των NETs. Από²²².

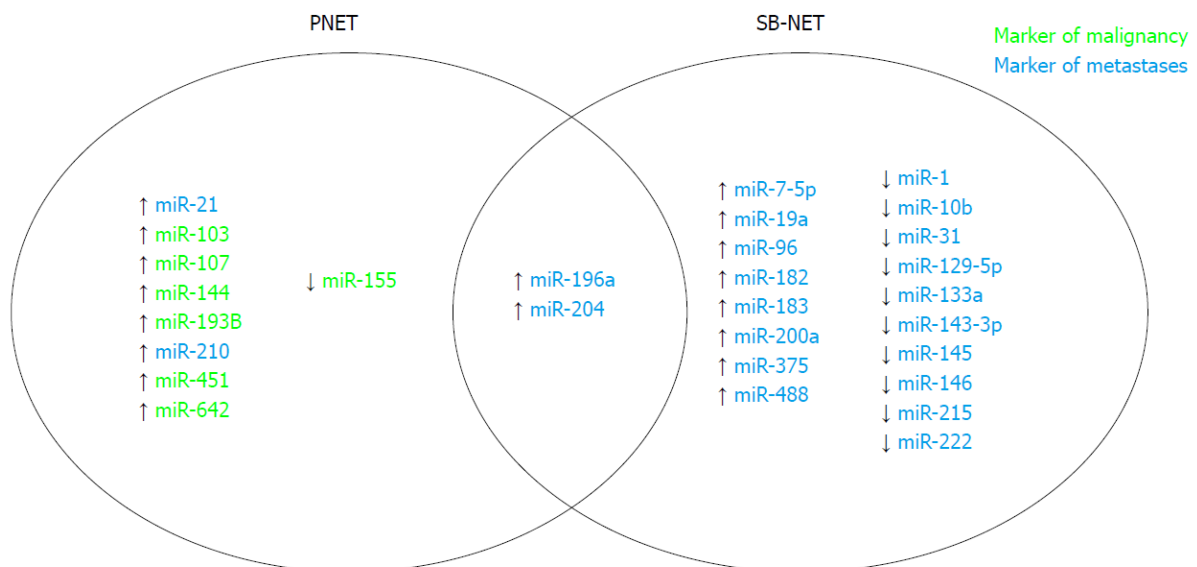
MicroRNAs στα NENs

Πρόσφατες μελέτες έχουν αρχίσει να επικεντρώνονται στην δημιουργία ενός κοινού προφίλ miRNA για τα GEP-NENs. Τα miRNAs διαδραματίζουν έναν κατά κύριο μετά-μεταγραφικό ρόλο είτε αναστέλλοντας τη μετάφραση του mRNA είτε προάγοντας την αποικοδόμηση του mRNA. Πολλά διαφορετικά ειδικά miRNAs έχουν ήδη έχει εντοπιστεί με ένα σημαντικό εύρος κλινικών επιπτώσεων στα GEP-NENs (Εικ. 44). Ένζυμα που εμπλέκονται στις επιγενετικές τροποποιήσεις των miRNAs Όπως τα DNMTs και HDACs είναι, επομένως, ελκυστικό στόχος για θεραπεία²⁶⁷. Ενώ οι προγνωστικές και θεραπευτικές συνέπειες αυτών των αλλαγών είναι ακόμα αμφιλεγόμενες, αυτά τα ευρήματα παρέχουν ένα ισχυρό θεμέλιο για μελλοντικές έρευνες^{222, 255, 256, 268-274}.

lncRNA στα NENs

Οι τρέχουσες γνώσεις σχετικά με την παθογένεια και τις προγνωστικές δυνατότητες των lncRNAs είναι ακόμα σε προκαταρκτικά στάδια. Ωστόσο, μία μελέτη μέχρι στιγμής έχει αναδείξει

ένα ενδεχομένως σχετικό με τα GEP-NENs lncRNA ²⁷⁵. Αυτή η αρχική μελέτη του lncRNA σε pNENs έχει επισημάνει την δυνητική σημασία της επιγενετικής ρύθμισης του lncRNA στην ανάπτυξη των NENs.



Εικόνα 44: MicroRNAs σε NENs pNETs και sb-NETs (si-NENs). Από ²²².

Κλινική χρησιμότητα

Η εφαρμογή της μοριακής πληροφορίας που έχουμε και θα αποκτήσουμε στο μέλλον για τα NENs παρέχουν πρόσθετες πληροφορίες στην θεραπεία των GEP-NENs και μπορούν να εφαρμοσθούν σε τρεις κύριους τομείς: την λειτουργική απεικόνιση (FIS) ⁴, την εφαρμογή της μεταγραφικής τεχνολογίας στη διάγνωση και τέλος στην αναγνώριση νέων φαρμακευτικών στόχων ⁶.

Έτσι σήμερα πολλές λειτουργικές διαγνωστικές εξετάσεις βασίζονται σε αυτή την πληροφορία κυρίως μέσω των υποδοχών σωματοστατίνης όπως τα ¹¹¹In-pentetreotide (ή OctreoScan), ^{99m}Tc-HYNIC-TOC, PET/⁶⁸Ga-DOTA-SSA peptides (DOTA-NOC, -TOC, και -TATE), αλλά και τεχνικές PET με πρόδρομες αμίνες όπως η ¹⁸F-DOPA and ¹¹C-5-hydroxytryptophan ²⁷⁶. Η αναγνώριση νέων μεταφορέων (transporters) και μεταβολικών μορίων θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη των πρόσθετων στρατηγικών για την διάγνωση και τον ορισμό της λειτουργικότητας του όγκου.

Τα ραδιοσημασμένα SSAs χρησιμοποιούνται κυρίως λόγω των theranostic ⁵ ιδιοτήτων τους, δηλαδή την ικανότητα του ίδιου του πεπτιδικού υποδοχέα να χρησιμοποιείται για απεικόνιση ή θεραπεία, αλλά αλλάζοντας το ραδιοϊσότοπο ²⁷⁷⁻²⁷⁹. Φαίνεται πιθανό ότι με τη χρήση μιας άλλης, εκτός υποδοχέα G-πρωτεΐνης, στρατηγικής αναζήτησης μοριακής βάσης, διάφορα πεπτίδια θα ταυτοποιηθούν για κλινικά χρήση, έτσι όπως έγινε και με την ¹⁸F-FDG PET, που χρησιμοποιείται πλέον για διαγνωστικούς και προγνωστικούς σκοπούς ²⁸⁰ (Εικ. 45).

Οι υπάρχουσες μοριακές προσεγγίσεις δεν έχουν εντοπίσει ομοιόμορφα εκφρασμένες νέες στοχευμένες αλληλουχίες DNA στα NENs που να μπορούν να στοχευθούν φαρμακευτικά, αν και υπάρχει το μονοπάτι της mTOR, όμως μόνον το ~15% των pNENs έχει τις μεταλλάξεις, έτσι αυτό

⁴ FIS = Functional imaging studies.

⁵ Theranostics = treatment and diagnostics.

παραμένει περιορισμένος στόχος για τους αναστολείς της mTOR (π.χ., everolimus) ²⁸¹. Εντούτοις, αυξάνει τη δυνατότητα να αναδειχθεί το γονίδιο *menin* ως υποψήφιος στόχος ²⁸². Το *Menin* είναι η συνηθέστερα αλλοιωμένη θέση γονιδίου στα GEP-NEN (~50% των pNENs καθώς και στα gNENs) και η αλληλεπίδρασή του με το P27 μονοπάτι σηματοδότησης (που είναι μεταλλαγμένο στα si-NEN) υποδηλώνει ότι μπορεί να είναι ένας κοινός στόχος που να περιλαμβάνει τόσο τα pNENs όσο και si-NENs, γεγονός που μάλλον μπορεί να δουλέψει στην λευχαιμία ²⁸²⁻²⁸⁴. Το γονίδιο και οι οδοί του είναι δύσκολο να στοχευθούν τεχνικά, για αυτό μάλλον θα απαιτηθεί σχεδιασμός της επόμενης γενεάς αναστολέων για αποτελεσματική στόχευση στα GEP-NENs ⁶. Μια τέτοια προσέγγιση είναι ο σχεδιασμός φαρμάκων έναντι στον δρόμο του TGF- β που συνδέεται επίσης με το *menin* (το μονοπάτι TGF- β /SMAD μεταβάλλεται στο 25% των si-NENs), και η στόχευση σε αυτόν τον τομέα μπορεί να προσφέρει μια εναλλακτική προσέγγιση, όπως γίνεται ήδη με αρκετούς παράγοντες (π.χ. SD-208 κ.α.) που δοκιμάζονται ήδη στο μελάνωμα και σε παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα ²⁸⁵. Επειδή δεν υπάρχουν επί του παρόντος διαθέσιμα κλινικά δεδομένα, μένει να δούμε αν οι προσεγγίσεις αυτές θα μπορούσαν να είναι αποτελεσματικές.

Σήμερα που η τεχνολογία αποκτά συνεχώς σημαντικές δυνατότητες η μεταφραστική μεταγραφική γονιδιωματική σε συνδυασμό με τεχνολογίες δικτύων, μπορούν να μας δώσουν την ικανότητα μαζικά να ανιχνεύουμε προβληματικά γονίδια και τα προϊόντα τους και να έχουμε έτσι πληροφορίες για την κυτταρική εργαλειοθήκη των NENs, δηλαδή τις οδούς που σχετίζονται με κακοήθεια και/ή μεταστάσεις και την σχέση τους με διάφορα φάρμακα. Η εξερεύνηση αυτού του πλούτου της πληροφορίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο μετάφρασης για καλύτερη διαχείριση και αξιολόγηση της νεοπλασματικής συμπεριφοράς.

Έχουν ταυτοποιηθεί πολλαπλά γονίδια ή γονιδιακά προϊόντα που θα μπορούσαν να παρέχουν θεραπευτικούς στόχους (π.χ. FEV ή MTA1), ή για να χρησιμοποιηθούν ως μετρήσιμοι βιοδείκτες ή για την αξιολόγηση της βιολογία του όγκου ή τον εντοπισμό νέων φαρμακευτικών στόχων (στοχευμένη δικτυακή προσέγγιση) ^{286, 287}. Οι νέες αυτές τεχνολογίες έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ταξινόμηση των υπό-τύπων των si-NENs και μπορούν με ακρίβεια (100%) να προβλέψουν τις μεταστάσεις ²¹⁸.

Επειδή το περιφερικό αίμα όμως είναι πιο προσιτό για το γονιδιακά tests από τον ιστό, η PCR έχει χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση κυκλοφορούντων δεικτών στα NENs. Κυκλοφορούντα mRNAs του όγκου μπορεί να ανιχνευθούν στο πλάσμα και ένας συνδυασμός της έκφρασης των και των μετρήσεων των κυκλοφορούντων ορμονών και αυξητικών παραγόντων μας δίνει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για τη διάγνωση των si-NENs (81,2% και 100% αντίστοιχα) ²⁸⁸. Το NETest (Wren Laboratories, Branford, CT), μια πιο πρόσφατη πολυαναλυτική αλγοριθμική ανάλυση, που περιλαμβάνει 51 δείκτες γονιδίων, δίνει υψηλή ευαισθησία (> 95%) και ειδικότητα (> 95%) για την ανίχνευση των GEP-NENs και παρέχει μια πολυδιάστατη (ανάλυση συμπλέγματος γονιδίων) αξιολόγηση της κατάστασης της νόσου ^{6, 289, 290}. Πολλαπλές στρατηγικές αλγοριθμικής ανάλυσης αυτού του τύπου είναι σημαντικά ακριβέστερες από τον προσδιορισμό των CgA και παγκρεαστατίνης ²⁹¹⁻²⁹⁴ και δεν επηρεάζονται από την λήψη PPIs ²⁹⁵. Ειδικά το NETest έχει αποδείξει ότι είναι ένας πιο ευαίσθητος προγνωστικός και προγνωστικός βιοδείκτης, από την CgA για την διάγνωση σε GEP-NENs και μετά από κάθε είδους θεραπεία (χειρουργική ή κυτταρομειωτική χειρουργική, θεραπείες που κατευθύνονται στο ήπαρ και συστηματικές θεραπείες, συμπεριλαμβανομένων των SSAs, των στοχευμένων παραγόντων (sunitinib, everolimus), της χημειοθεραπείας και της PRRT ²⁹⁶⁻²⁹⁹. Ως εκ τούτου, το NETest μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματικό εργαλείο για τη διάγνωση και την παρακολούθηση ασθενών με NENs.

Αρκετές μεταφραστικές μελέτες παρέχουν πειστικές πληροφορίες που εντοπίζουν δυνητικούς προγνωστικούς βιοδείκτες, και μερικοί από αυτούς έχουν δείξει προκαταρκτική επιτυχία ως βιοδείκτες του ορού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν κλινικά. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν πολλές ευκαιρίες για τον περαιτέρω προσδιορισμό των μηχανισμών με τους οποίους αυτές οι επιγενετικές τροποποιήσεις επηρεάζουν την ογκογένεση, και αυτό θα παρέχει καλύτερη εικόνα της προγνωστικής και θεραπευτικής χρησιμότητάς τους. Επιπλέον, αυτά τα ευρήματα αποτελούν τη βάση για τις μελλοντικές μελέτες που αξιολογούν την κλινική αποτελεσματικότητα των επιγενετικών τροποποιήσεων ως προγνωστικών βιοδεικτών, καθώς και δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους.

Η συνέχεια της έρευνας είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό των μηχανισμών, με τον οποίο αυτές οι επιγενετικές τροποποιήσεις επηρεάζουν την ογκογένεση των GEP-NENs, παρέχοντας καλύτερες γνώσεις για την χρησιμότητά της επιγενετικής για προγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. Δυστυχώς μέχρι τώρα υπάρχει πολύ περιορισμένη επιτυχία σε όλα αυτά ^{222, 300} και δεν έχει ακόμα επιχειρηθεί κάποια θεραπεία με στόχευση τα miRNAs ³⁰¹⁻³⁰³. Μόνο μια μελέτη φάσης II έχει δημοσιευθεί με την χορήγηση depsipeptide (HDAC αναστολείς) ³⁰⁴, όμως η μελέτη γρήγορα έκλεισε λόγω σοβαρής καρδιοτοξικότητας στους ασθενείς. Έτσι απαιτούνται περισσότερες μελέτες που να αξιολογούν την νέα αυτή αντινεοπλασματική προσπάθεια σε in vitro και in vivo πειράματα πριν μελλοντικές προσπάθειες σε κλινικές δοκιμές είναι εφικτές ^{222, 300}.

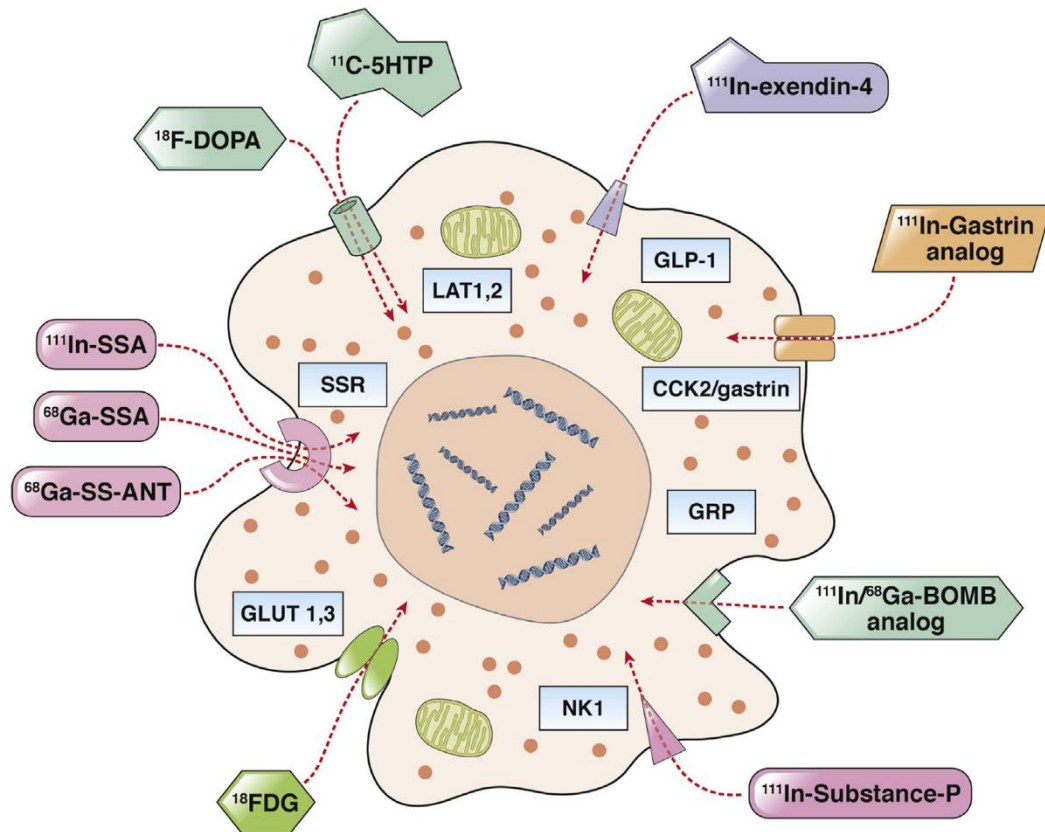
Παρόλα αυτά, τα αυξανόμενα στοιχεία που υποστηρίζουν έναν σημαντικό ρόλο των επιγενετικών τροποποιήσεων σε NENs αναγκάζουν για περαιτέρω ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών στον τομέα αυτόν, εστιάζοντας στη βελτίωση της επιλογή των ασθενών και καλύτερο σχεδιασμό κλινικών μελετών. Φαίνεται ακόμη ότι ίσως ένας νέος αναστολέας της μεθυλίωσης του DNA και της διακετυλίωσης, (ο RRx-001) φανεί χρήσιμος μια και αναστέλλει την απελευθέρωση της ορμόνης σε έναν ασθενή με καρκινοειδές σύνδρομο ³⁰⁵. Μελλοντικές μελέτες απαιτούνται για να επιβεβαιωθεί αυτή η παρατήρηση.

Το πεδίο της επιγενετικής εξελίσσεται συνεχώς και σημαντικά βήματα έχουν γίνει για να καθοριστεί η σχετικότητά της στην ογκογένεση των GEP-NENs. Η τρέχουσα βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι υπάρχουν μοτίβα μεθυλίωσης και αναδιαμόρφωση χρωματίνης και microRNAs και lncRNAs προφίλς που είναι χαρακτηριστικά των GEP-NENs, μερικά από τα οποία συσχετίζονται με φτωχότερα κλινικά αποτελέσματα. Ωστόσο, δεδομένης της ποικιλίας των GEP-NENs, τα αποτελέσματα είναι συγκεχυμένα και πολλές φορές αντικρουόμενα. Ως εκ τούτου, απαιτούνται μεγαλύτερες μελέτες με αυστηρότερα κριτήρια που θα αξιολογήσουν τη χρησιμότητα των επιγενετικών αλλαγών ως βιολογικοί προγνωστικοί δείκτες, καθώς και ως πιθανών θεραπευτικών στόχων.

Συνολικά, η έλλειψη αποτελεσματικών φαρμακευτικών θεραπειών αντιπροσωπεύει την περιορισμένη κατανόηση της βιολογική βάσης των NENs και την ανεπάρκεια πληροφοριών σχετικά με τη μοριακή φύση της νόσου ^{6, 306}.

Η απογοητευτική αυτή κατάσταση αυτή έχει προκύψει για δύο λόγους. Πρώτον, η περιορισμένη χρηματοδότηση της έρευνας στο πεδίο των NENs που έρχεται από την θεώρηση ότι τα NENs έχουν χαμηλή συχνότητα και έτσι μικρές επιπτώσεις υγείας στον πληθυσμό και δεύτερον, τα NENs από την φύση τους χρειάζονται ένα τρομερό σε μέγεθος ερευνητικό έργο μια και τα επιμέρους νεοπλάσματα προκύπτουν από μια πληθώρα διαφορετικών τύπων κυττάρων (παρόλο το κοινό νευροενδοκρινικό στοιχείο τους) και συστήματα οργάνων με διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς που είναι δύσκολο να χαρακτηρισθούν και να κατανοηθούν ³⁰⁷.

Η έρευνα στη γενετική των NENs είναι έντονη και ελπίζουμε σύντομα να δούμε νέες εξελίξεις που θα μας βοηθήσουν τα μέγιστα στην κατανόηση της βιολογίας των αλλά κυρίως στην επιλογή της θεραπείας, στην ανακάλυψη νέων θεραπειών αλλά και στην πρόγνωση των NENs³⁰⁸⁻³¹².



Εικόνα 45: Η λειτουργική απεικόνιση (FIS) των GEP-NENs χρησιμοποιεί ραδιοενεργούς συνδέτες (ligands). Τα ραδιοσημασμένα ανάλογα σωματοστατίνης (SSA) είναι τα πλέον χρησιμοποιούμενα. Το σπινθηρογράφημα με ¹¹¹In-pentetreotide και το ⁶⁸Ga-SSA/PET θεωρούνται ως τα βέλτιστα εργαλεία πυρηνικής απεικόνισης των NENs. Εναλλακτικές τεχνικές PET με πρόδρομες αμίνες όπως ¹⁸F-DOPA και ¹¹C-5HTP έχουν επίσης δείχθει ότι είναι ευαίσθητες. Οι πειραματικές τεχνικές περιλαμβάνουν τη χρήση του SSR antagonists, GLP-1, GRP, και NK ligands. BOMB = bombesin. ¹¹C-5HTP = ¹¹C-hydroxy-tryptophan. ¹⁸FDG = ¹⁸F-fluoro-2-deoxyglucose. ¹⁸F-DOPA = ¹⁸F-fluoro-IL-DOPA. ⁶⁸Ga-SSA = ⁶⁸Ga-DOTATOC, ⁶⁸Ga-DOTANOC, ⁶⁸Ga-DOTATATE. ⁶⁸Ga-SS-ANT = ⁶⁸Ga-labeled SSR antagonists. GLP-1 = glucagon-like peptide-1 receptor. GLUT-1,3 = glucose transporter type 1 and 3. GRP = gastrin-releasing peptide receptor. ¹¹¹In-SSA = ¹¹¹In-Pentetreotide, ¹¹¹In-Depreotide, 99mTc-EDDA-HYNIC-Tyr3-octreotide. LAT 1,2 = large neutral amino acid transporter type 1 and 2. NK1 = neurokinin 1 receptor. SSR = somatostatin receptor. Από ⁶.

Συμπέρασμα

Τα GEP-NENs αντιπροσωπεύουν μια διαφορετική ομάδα νεοπλασιών που παρουσιάζουν μια μοναδική παθοβιολογία και ένα νεοπλασματικό μοριακό πρότυπο το οποίο είναι ουσιαστικά διαφορετικό από άλλα επιθηλιακά νεοπλάσματα. Οι παραδοσιακές προσεγγίσεις προσδιορισμού της ακολουθίας του DNA για τη διερεύνηση της μοριακής βάση των NENs έχουν, μέχρι σήμερα, αποδώσει σχετικά λίγες πληροφορίες (με εξαίρεση τα pNENs).

Κατά συνέπεια, ένα σημαντικό ερώτημα που μας βασανίζει είναι να χαρακτηρίσουμε, τι αποτελεί τον οδηγό της νεοπλασματικής ανάπτυξης των NENs. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει

ανεύρεση εστίας σε non-coding RNA ή RNA μακράς αλύσου, καλύτερη οριοθέτηση του επιγονιδιώματος (και πώς αυτό ρυθμίζεται) ²²², ή τον προσδιορισμός παράγοντος/ων στο μικροπεριβάλλον του όγκου που η ενεργοποίηση του να οδηγεί σε νεοπλασία σε ογκοκατασταλτικό περιβάλλον. Είναι πιθανό ότι η μεταγραφική και οι αναλύσεις δικτύων, ειδικά εάν διασυνδέονται με πρωτεϊνωματική ανάλυση, μπορεί να βοηθήσει σε περαιτέρω προσδιορισμό της νευροενδοκρινικής κυτταρικής εργαλειοθήκης. Η στρατηγική αυτή θα συμβάλει στην επίλυση του ογκολογικού αινίγματος των GEP-NENs καθώς και στην ακριβή μοριακή απεικόνιση της νόσου των NENs.

Με αυτή την προσέγγιση στο μυαλό, μια πλήρης περιγραφή των κύριων ρυθμιστών και του γονιδιακού πλέγματος των NENs, είναι ζητούμενο, για να μπορέσει να ανευρεθεί τι καθορίζει τις μεταστάσεις, και φυσικά για να προσδιορίσουμε τους υποψήφιους φαρμακευτικούς στόχους μας ⁴.

Ιδιαίτερη σημασία έχει η ανάδειξη των ρυθμιστικών αλλαγών που εμφανίζονται όταν ο πρωτοπαθής όγκος εξελίσσεται σε μεταστατικό φαινότυπο και τα σημεία κλειδιά σε αυτήν την πορεία να αναδειχθούν και να αποτελέσουν φαρμακευτικό στόχο όπως π.χ., τα PI3K, Akt, mTORC1/mTORC2, GSK3, c-Met, Ras-Raf-MEK-ERK, τα εμβρυογενή μονοπάτια (Hedgehog, Notch, Wnt/beta-catenin, TGF-beta signalling and SMAD proteins), τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και οι κυτταρικοί ρυθμιστές (p53, cyclin-dependent kinases (CDKs) CDK4/6, CDK inhibitor p27, retinoblastoma protein (Rb)), heat shock protein HSP90, Aurora kinase, Src kinase family, focal adhesion kinase και επιγενετική διαμόρφωση με αναστολείς της ιστόνης αποακετυλάσης ³¹³.

Ένα άλλο σημαντικό ζήτημα είναι να βρούμε ακριβή συστήματα αναφοράς που μπορούν να μετρήσουν και να προβλέψουν την αποτελεσματικότητα των φαρμακευτικών θεραπειών. Επειδή η επαναλαμβανόμενη βιοψία των μεταστάσεων δεν είναι βιώσιμη κλινική επιλογή, η ανάπτυξη στρατηγικών με βάση το αίμα ώστε να μπορούμε να μετρούμε και να αξιολογούμε τις αλλαγές αυτές της κυκλοφορούσας μοριακής υπογραφής, έχουν κρίσιμη σημασία για τη διαχείριση και στρατηγική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η απόκτηση απαντήσεων σε αυτά τα κρίσιμα ερωτήματα θα έχει κλινική χρησιμότητα για την ανάπτυξη νέων απεικονίσεων, βιοδεικτών και για την πρόοδο ειδικών θεραπευτικών στρατηγικών για τα NENs.

Οι νεοπλασματικοί μετασχηματισμοί αυτών των κυττάρων του DNES είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη των GEP-NENs (GEP-NENs). Οι όγκοι αυτοί αποτελούν σπάνια νεοπλάσματα του γαστρεντερικού σωλήνα και του παγκρέατος που συχνά εκκρίνουν ορμονικά ενεργούς παράγοντες, προκαλώντας ξεχωριστά κλινικά σύνδρομα.

Ορισμένοι τύποι κυττάρων βρίσκονται σε ένα όργανο και παράγουν συγκεκριμένα προϊόντα που οδηγούν σε σαφώς καθορισμένα κλινικά σύνδρομα (π.χ., β-κύτταρα στο πάγκρεας και ινσουλινώματα), ενώ άλλοι παράγουν ένα ευρύ φάσμα νόσων και είναι σε μια ποικιλία από τοποθεσίες (π.χ., εντεροχρωμιόφιλα κύτταρα, εντεροχρωμαφινικά, enterochromaffin, EC και κύτταρα σωματοστατίνης) στο στομάχι, το λεπτό και το παχύ έντερο.

Τα NE κύτταρα του ΓΕΣ παράγουν όχι μόνο γαστρεντερικές ορμόνες όπως η γαστρίνη, η γρελίνη, η σεκρετίνη, η χολοκυστοκινίνη (CCK), το γαστρικό ανασταλτικό πεπτίδιο (GIP) και η μοτιλίνη (motilin), αλλά και παρακρινείς ορμόνες ⁶. Εκτός από τις καθιερωμένες γαστρεντερικές ορμόνες, αρκετά γαστρεντερικά πεπτίδια δεν έχουν με σιγουριά καταταγεί ως ορμόνες ή παρακρινείς ορμόνες. Αυτά τα πεπτίδια χαρακτηρίζονται ως υποψήφιες ή δήθεν ορμόνες. Άλλες τοπικά δραστικές ουσίες που απομονώνονται από το γαστρεντερικό βλεννογόνο είναι

⁶ Μια παρακρινής ορμόνη διαφέρει από μια ενδοκρινική ορμόνη στο ότι διαχέεται σε τοπικό επίπεδο προς το κύτταρο προορισμού, αντί να μεταφέρεται από την κυκλοφορία του αίματος προς το κύτταρο αυτό.

νευροδιαβιβαστές. Αυτοί οι παράγοντες απελευθερώνονται από νευρικές απολήξεις κοντά στο κύτταρο προορισμού, συνήθως τους λείους μύες της βλεννογόνιας μυϊκής στοιβάδας (muscularis mucosae), του μυϊκού χιτώνα του εντέρου ή του μέσου χιτώνα των αγγείων. Τα εντεροενδοκρινή κύτταρα μπορεί να εκκρίνουν επίσης νευροδιαβιβαστές που ενεργοποιούν προσαγωγούς νευρώνες, που στέλνουν σήματα στο ΚΝΣ και στα εντερικά τμήματα του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Εκτός από την ακετυλοχολίνη (που δεν είναι πεπτίδιο), πεπτίδια που ανευρίσκονται στις νευρικές ίνες του γαστρεντερικού σωλήνα είναι οι εγκεφαλίνες, το αγγειοενεργό εντερικό πεπτίδιο (VIP) και η βομβεσίνη (bombesin). Έτσι, ένα συγκεκριμένο πεπτίδιο μπορεί να παραχθεί από τα ενδοκρινή και παρακρινή κύτταρα, και επίσης να ανευρίσκεται σε νευρικές ίνες.

Όπως και για τα περισσότερα από τα άλλα νεοπλασμάτα του σώματος, η αιτιολογία και η παθογένεια των GEP-NENs είναι ουσιαστικά άγνωστες. Ωστόσο, γενετικές ανωμαλίες προκαλούν κυτταρική ανάπτυξη, ως αποτέλεσμα της υπερδιέγερσης από ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες που είναι γνωστό ότι είναι υπεύθυνοι για την έναρξη της NE υπερπλασίας και την δημιουργία όγκων^{314, 315}. Ορισμένα άτομα έχουν προδιάθεση για την ανάπτυξη τέτοιων όγκων λόγω κληρονομικών γενετικών αλλοιώσεων, όπως στα σύνδρομα MEN-1, von Hippel-Lindau, NF-1 κλπ.^{149, 316}.

Έτσι από ένα NE κύτταρο, οπουδήποτε στο πεπτικό σύστημα (ΓΕΣ, ήπαρ, πάγκρεας χοληφόρα) μπορεί να αναπτυχθεί ένα GEP-NEN με παραγωγή ή όχι ορμονών και με αυτούς τους όγκους θα ασχοληθούμε σε αυτό το βιβλίο (Εικ. 46).

Η κατανόηση της κανονικής κατανομής των νευροενδοκρινικών κυττάρων στο ΓΕΣ είναι σημαντική, επειδή υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της κατανομής των συγκεκριμένων τύπων των (νεύρο)ενδοκρινικών κυττάρων και την θέση των GEP-NENs εντός του ΓΕΣ. Ωστόσο, υπάρχουν μερικές εξαιρέσεις, και έτσι δεν έχει (ακόμα) αναφερθεί όγκος λεπτού εντέρου με παραγωγή χολοκυστοκινίνης, ή γαστρικού ανασταλτικού πολυπεπτιδίου, ή μοτιλίνης, ή όγκοι σεκρετίνης³¹⁷. Ομοίως, η κυριαρχία των NENs εκ των εντεροχρωμαφινικών (EC) κυττάρων που εκκρίνουν σεροτονίνη, στον ειλεό και την σκωληκοειδή απόφυση, και των NENs εκ δ (d) κυττάρων που εκκρίνουν σωματοστατίνη στο δωδεκαδάκτυλο και την λήκυθο του Vater είναι ανώμαλη, μια και τα EC και τα δ (d) κύτταρα έχουν ομοιόμορφη κατανομή σε όλο το ΓΕΣ συμπεριλαμβανομένου του παγκρέατος και των χοληφόρων³¹⁷. Επίσης τα γαστρινώματα του παγκρέατος δεν μπορεί να εξηγηθούν από την κατανομή αυτή μια και δεν υπάρχουν G κύτταρα στο πάγκρεας του ενήλικα.

Έτσι, οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την φαινοτυπική έκφραση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων του DNES δεν είναι επαρκώς κατανοητοί. Ομοίως, η βάση για την ανάπτυξη νεοπλασίας στο DNES που εμφανίζεται κυρίως στο ΓΕΣ και το ΑΣ (αναπνευστικό σύστημα) δεν είναι εύκολα κατανοητή^{32, 318} και οι όγκοι αυτοί μπορεί να είναι από αδρανείς, παραγνωρισμένες οντότητες που βρίσκονται συχνά τυχαία, μέχρι ιδιαίτερα ενεργοί μεταστατικοί εκκριτικοί όγκοι όπως τα GEP-NENs του ειλεού^{7, 319, 320}.

Παρά το γεγονός ότι τα NETs διαφορετικών ανατομικών περιοχών μπορούν να μοιράζονται μερικές βασικές ιστολογικές, κλινικές, και βιολογικές ιδιότητες, η μεμονωμένη συμπεριφορά κάθε όγκου μπορεί να ποικίλει ουσιαστικά, από την άποψη της τοπικής επιθετικότητας και της ικανότητας μεταστάσεων. Ως ένα ορισμένο βαθμό αυτό εξαρτάται από το από ποιο όργανο και από ποια κύτταρα προέρχονται οι όγκοι, αλλά και από άλλους σχετικούς καθοριστικούς μοριακούς παράγοντες ειδικούς για την πρόβλεψη της τοπικής διήθησης, την ανάπτυξη δεσμοπλασίας και μετάστασης, παράγοντες που μέχρι σήμερα δεν είναι καλά καθορισμένοι³²⁰.

Οι νευροενδοκρινείς όγκοι είναι τουλάχιστον 40, σε διάφορα όργανα και οι ονομασίες τους, ακόμα και σήμερα προκαλούν σύγχυση, και μία από τις επιδιώξεις αυτού του βιβλίου, είναι να διαλύσει αυτήν την σύγχυση (όσο μπορούμε) για τον Έλληνα Ιατρό ειδικά για τα GEP-NENs.

Τα νεοπλάσματα του ΝΕΣ είναι λοιπόν πολλά και θα μπορούσαν να καταταγούν σύμφωνα με μια κατάταξη (Εικ. 47) σε όγκους από:

1. νευρικές δομές (π.χ., παραγαγγλιώματα)
2. το διάχυτο ΝΕΣ (DNES) (π.χ., si-NENs ή pNENs)
3. τους ενδοκρινείς αδένες (π.χ., φαιοχρωμοκύτωμα)

Τα NENs, ταξινομούνται με διάφορες κλινικές ταξινομήσεις, όπως για παράδειγμα:

1. ανάλογα με την εμβρυολογική τους προέλευση όπως είπαμε (foregut, midgut, hindgut),
2. την ανατομική θέση προέλευσης τους (πνεύμονας, ΓΕΣ (παγκρεατικά και μη παγκρεατικά NENs)) και
3. ανάλογα της έκκρισης διαφόρων πεπτιδίων και νευροαμινών (ινσουλίνη, γαστρίνη, γλυκαγόνη, VIP, σωματοστατίνη κ.α.) σε:
 - a. λειτουργικά και
 - b. μη λειτουργικά.

Ειδικότερα, η ανατομική περιοχή προέλευσης και ειδικά στα GEP-NENs (pNENs, non pNENs) αναγνωρίζεται πλέον ως καθοριστικό παράγοντα της επιλογής της θεραπείας. .

Επίσης τα ενδοκρινή νεοπλάσματα μπορούν να διαιρεθούν σύμφωνα με τη χημική φύση των προϊόντων έκκρισής τους, σε δύο ομάδες.

1. Τα νεοπλάσματα που παράγουν και εκκρίνουν γλυκοπρωτεϊνικές ορμόνες και βιογενείς αμίνες (π.χ., ινσουλίνωμα).
2. Τα νεοπλάσματα που παράγουν στεροειδείς ορμόνες (π.χ., όγκοι φλοιού επινεφριδίων). Αυτά δεν θα αποτελέσουν αντικείμενο του βιβλίου αυτού μια και αποτελούν αντικείμενο της χειρουργικής των ενδοκρινών αδένων.

Οι όγκοι της πρώτης ομάδας, είναι αυτοί που θα ασχοληθούμε στο παρόν βιβλίο, καλούνται νευροενδοκρινή νεοπλάσματα (NETs) λόγω των πρωτεϊνών δεικτών τους οποίους μοιράζονται με το νευρικό σύστημα (ΝΣ). Αυτοί οι δείκτες είναι κυρίως η συναπτοφυσίνη (synaptophysin) και η neuron-specific enolase (NSE). Άλλοι δείκτες με νευροενδοκρινή φαινότυπο είναι οι χρωμογρανίνες (chromogranins) A, B και C, οι προ-πρωτεϊνικές κονβερτάσες (convertases pro protein) PC2 και PC3^{321 322} και άλλοι πιο πρόσφατοι (Εικ. 48) . Το μόριο προσκόλλησης νευρικών κυττάρων CD56 είναι θετικό σε πολλά NETs, αλλά δεν είναι συγκεκριμένο για αυτούς τους όγκους³²³. Υπό το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα NETs παρουσιάζουν χαρακτηριστικούς νευροεκκριτογόνους κόκκους και όλα αυτά τα στοιχεία είναι κοινά στα GEP-NENs (foregut, midgut και hindgut προέλευσης) (είδαμε τις πληροφορίες αυτές στο προσέγγιση του Νευροενδοκρινολόγου και στην βιολογία του ΝΕΣ).

Οι γενικοί βιοδείκτες θα εξετασθούν σε ειδικό κεφάλαιο και οι ειδικοί δείκτες θα εξετασθούν ανάλογα με το ΝΕΝ στα οικεία κεφάλαια

Έτσι και συνοπτικά το DNES περιλαμβάνει ΝΕ κύτταρα που έχουν κοινά χαρακτηριστικά, όπως η έκφραση συγκεκριμένων δεικτών (π.χ., νευροπεπτίδια χρωμογρανίνες και ένζυμα επεξεργασίας νευροπεπτιδίων) και έχουν εκκριτικά κοκκία.

Τα ΝΕ αυτά κύτταρα συνθέτουν (-γλυκό) πεπτιδικές ορμόνες και βιογενείς αμίνες και ΝΕ κύτταρα ορίζονται ως τα κύτταρα³²⁴:

1. με τη δυνατότητα να παράγουν νευροδιαβιβαστές ή νευροπεπτιδικές ορμόνες
2. που περιέχουν πυκνούς εκκριτικούς κόκκους

3. και δεν έχουν νευριτικούς άξονες και συνάψεις.

Τα νευροενδοκρινικά κύτταρα του ΓΕΣ αποτελούν λιγότερο από το 1% του βλεννογόνου και κατανέμονται συνήθως στην επιφάνεια ή την βάση των επιθηλιακών κυττάρων των αδένων, όπως στα γαστρικά βοθρία του στομάχου και τις κρύπτες του λεπτού εντέρου και παχέος εντέρου και περιέχουν **εκκριτικά κοκκία** που απελευθερώνουν διάφορες πεπτιδικές ορμόνες^{1, 53}. Φυλογενετικά και οντογενετικά, τα NE κύτταρα προέρχονται από ένα τοπικό ενδοδερμικό αρχέγονο (stem) κύτταρο^{325, 326}. Τα NE κύτταρα αποτελούν επίσης το 1-2% του όγκου του παγκρέατος των ενηλίκων και τα περισσότερα σχηματίζουν τα νησίδια του Langerhans, αλλά μερικά είναι διάσπαρτα στους κύριους παγκρεατικούς πόρους και ενδιάμεσους παγκρεατικούς πόρους (interlobular, μεσολοβιώδεις) (PDGs) αλλά απουσιάζουν από τους μικρούς πόρους³²⁷.

Τα επιθηλιακά κύτταρα του ΝΕΣ διαμορφώνουν, ως ένα μεγάλο βαθμό, το παρέγχυμα των κλασικών ενδοκρινών αδένων. Τα περισσότερα όμως από αυτά τα κύτταρα εμφανίζονται διασκορπισμένα στους βλεννογόνους κυρίως της πεπτικής και αναπνευστικής οδού³²⁸, και καλούνται όπως είπαμε **“diffuse neuroendocrine system, (DNES)”**^{329, 330}. Η πολλαπλότητα των νευροενδοκρινικών κυττάρων **στον Γαστρεντερικό σωλήνα τον καθιστά το μεγαλύτερο ενιαίο ενδοκρινές όργανο**³³⁰.

Έτσι υπό τον όρο Νευροενδοκρινές σύστημα σε αυτό το βιβλίο αναφερόμεθα συνήθως και για πρακτικούς λόγους σε αυτά τα ενδοθηλιακά κύτταρα του διαχύτου νευροενδοκρινούς συστήματος (DNES) που ανευρίσκονται στον (Εικ. 15):

1. βλεννογόνο του ΓΕΣ,
 - a. που έχει τουλάχιστον 17 διαφορετικούς τύπους NE που παράγουν ορμόνες/πεπτίδια και/ή βιογενείς αμίνες^{1, 331-334} όπως η ειδική για τα νευρικά κύτταρα ενολάση (neuron specific enolase, NSE), η συναπτοφυσίνη (synaptophysin) και φυσικά οι χρωμογρανίνες Α, Β και C^{1, 331, 335} (Εικ. 30).
2. το πάγκρεας,
3. το ήπαρ
4. τα χοληφόρα
5. ενδοδερμικά κύτταρα διεσπαρμένα σε άλλες, από το ενδόδερμα προερχόμενες περιοχές, που προέρχονται από την ενθυλάκωση (invagination) του επιθηλίου του εμβρυϊκού αρχέγονου ανωτέρου εντέρου (foregut) όπως
 - a. ο θυροειδής αδένας,
 - b. οι πνεύμονες,
 - c. η ουρογεννητική οδός κα.

Τα επιθηλιακά NE κύτταρα τόσο στους ενδοκρινείς αδένες όσο και αυτά που είναι διάσπαρτα σε βλεννογόνους και δέρμα μπορούν να σχηματίσουν υπεραστικά οζίδια και γνήσιους νεοπλασματικούς όγκους^{336, 337}. Τα νεοπλάσματα με νεύρο εξωδερματική προέλευση περιλαμβάνουν τα παραγαγγλιώματα, νευροβλαστώματα, φαιοχρωμοκύττωμα και οσφρητικά νευροβλαστώματα και δεν αποτελούν αντικείμενο του βιβλίου αυτού παρά μόνον αναφορές θα γίνονται κυρίως για λόγους διαφορικής διάγνωσης.

Οι Νευροενδοκρινείς όγκοι (NENs) είναι μια ομάδα κακοηθειών με διαφορετική κλινική εικόνα και ετερογενή παθογένεση, τα οποία έχουν κοινή προέλευση από τα NE του διαχύτου ΝΕΣ και φυσικά λόγω αυτής της καταγωγής μπορεί να αναπτυχθούν σε κάθε όργανο αλλά πιο συχνά είναι τα GEP-NENs και τα NENs του πνεύμονα (Εικ. 49). Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα NE κύτταρα μπορεί να είναι μέρος συνθέτων βλαβών που έχουν αδενοκαρκινωματώδη στοιχεία και η ακριβής καταγωγή τους σε τέτοιες περιπτώσεις είναι ασαφής¹.

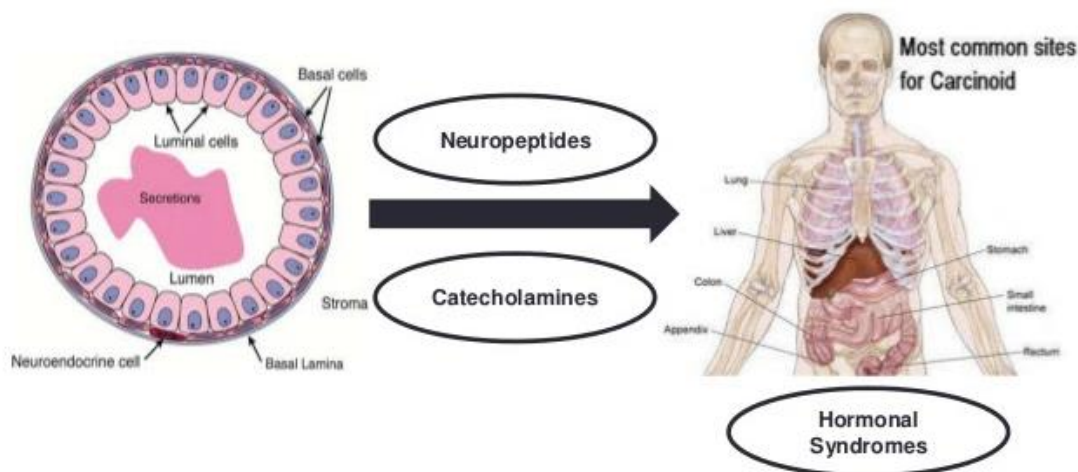
Τα κύτταρα των NENs έχουν τους ίδιους δείκτες όπως τα NE κύτταρα, και έτσι είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τον χαρακτήρα των NE κυττάρων. Τα NENs ενός οργάνου συνήθως έχουν κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά αλλά σπάνια μπορεί να προκύψουν δυσκολίες με ασυνήθη μορφολογία³³⁸

Τα NENs από τις 4 πρώτες κατηγορίες κυρίως, θα αποτελέσουν το αντικείμενο του βιβλίου αυτού και ονομάζονται γαστρεντεροπαγκρεατικά NENs (GEP-NETs ή GEP-NENs) μια και τα GEP-NENs αποτελούν την μεγάλη πλειοψηφία των NENs (Εικ. 49).

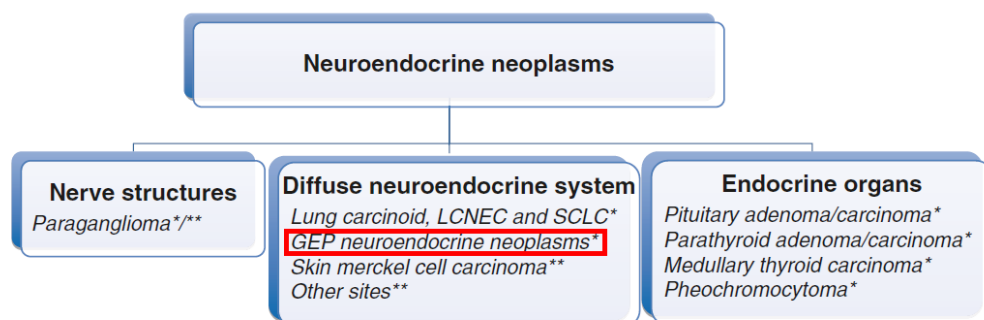
Καθώς όλα τα NENs (εκτός από το μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα) είναι σπάνια και, επιπλέον, παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές στη μορφολογία, φυσική ιστορία, ορμονική παραγωγή, είναι φυσικό η εκτίμηση της πρόγνωσης και ανταπόκρισης τους στην θεραπεία αποδείχθηκε δύσκολη για μεγάλο χρονικό διάστημα⁴⁴.

Αν και συνολικά οι όγκοι αυτοί ομαδοποιούνται ως νεοπλασματική οντότητα (NENs), κάθε βλάβη προέρχεται από ξεχωριστά πρόδρομα κύτταρα, παράγει συγκεκριμένα βιοδραστικά προϊόντα, έχει διακριτές χρωμοσωμιακές ανωμαλίες και σωματικές μεταλλάξεις και έχει μοναδικά ανόμοια κλινική εικόνα.

Τα GEP-NENs έχουν πολύ διαφορετικά ποσοστά επιβίωσης που αντικατοπτρίζουν τις εγγενείς διαφορές στο κακόηθες δυναμικό τους και τις παραλλαγές της πολλαπλασιαστικής ρύθμισης τους. Εκτός από την αναγνώριση του ανασταλτικού ρόλου των υποδοχέων σωματοστατίνης, υπάρχει περιορισμένη βιολογική γνώση των βασικών ρυθμιστικών αρχών του πολλαπλασιασμού των και ως εκ τούτου περιορισμένη επιτυχία των φαρμακευτικών μας δράσεων. Παρόλο που οι προσπάθειες είναι έντονες με εισαγωγή νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων λόγω της ανεύρεσης σημείων κλειδιά στην παθογένεση τους όπως οι IGF-1, TGFβ¹ και μια ποικιλία από τυροσινικές κινάσες, νέες προσεγγίσεις είναι απαραίτητες που να μπορούν να καθορίσουν προβλέψιμα, αποτελεσματικά και ορθολογικά την θεραπευτική στρατηγική μας σε κάθε όγκο ξεχωριστά.



Εικόνα46: Σχηματικά βλέπουμε την διαδρομή από το NE κύτταρο σε κλινικά σύνδρομα των GEP-NENs .



Εικόνα 47: Τύποι νευροενδοκρινών νεοπλασμάτων. LCNEC = large cell neuroendocrine carcinoma, SCLC = small cell lung carcinoma, GEP = gastroenteropancreatic tract. Σύμφωνα με την ταξινόμηση της WHO (World Health Organization) του 2010 (blue book series). *: digestive system (2010)³³⁹, lung, pleura, thymus, and heart (2015)^{340, 341}, endocrine organs (2004)³⁴². **: head and neck (2005)³⁴³, female reproductive organs (2014)³⁴⁴, breast (2012)³⁴⁵, urinary system and male genital organs (2016)³⁴⁶, skin (2006)³⁴⁷. Τροποποιημένη από ³⁴⁸.

General and tumour specific markers of GEP-NETs	
General markers	
Chromogranins	
Chromogranin A	
Chromogranin B	
Secretogranin II	
Secretogranin III (1B1075)	
Secretogranin IV (HISL-19)	
Secretogranin V (7B2)	
Secretogranin VI (NESP55)	
Neuron Specific Enolase	
Pancreatic polypeptide	
Chorionic gonadotrophin	
Tumor specific markers	
Carcinoid tumors	
24 h Urine 5-hydroxyindole acetic acid	
24 h Urine 5-hydroxy-tryptophan	
Plasma serotonin	
Insulinoma	
Fasting insulin	
Fasting pro-insulin	
Gastrinoma	
Fasting/stimulated gastrin	
Glucagonoma	
Fasting glucagon	
VIP-oma	
Fasting vasoactive intestinal peptide	
Somatostatinoma	
Fasting somatostatin	

Εικόνα 48: Οι βιοδείκτες των GEP-NENs. Από ^{349, 350}.

Organ system	Proportion, %
Gastroenteropancreatic system	70
Respiratory system	25
Other primary sites	5

NETs LOCALIZATION

Foregut

Thymus 0.4%

Lung 29.8%

Stomach 4.9%

Midgut

Small intestine 30.4%

Gallbladder, pancreas 1.0%

Hindgut

Appendix 5.1%

Colon 9.2%

Rectum 14.5%

Εικόνα 49: Η σχετική συχνότητα των NENs ανάλογα με την ανατομική τους θέση. Τροποποιημένη από ^{44, 82, 351, 352}.

ΕΣ Φελέκουρας
Καθηγητής Χειρουργικής
Α' Χειρουργική Κλινική ΕΚΠΑ
ΠΓΝΑ Λαϊκό, Αθήνα
www.felekouras.gr

Βιβλιογραφία

1. Schimmack S, Svejda B, Lawrence B, et al. The diversity and commonalities of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Langenbecks Arch Surg* 2011; 396(3):273-98.
2. Levine JE. An Introduction to Neuroendocrine Systems. Handbook of Neuroendocrinology. San Diego: Academic Press; 2012:pp. 3-19.
3. Bisset GW, Chowdrey HS. Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. *Q J Exp Physiol* 1988; 73(6):811-72.
4. Amair-Pinedo F, Matos I, Sauri T, et al. The Treatment Landscape and New Opportunities of Molecular Targeted Therapies in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Target Oncol* 2017; 12(6):757-774.
5. Gustafsson BI, Kidd M, Modlin IM. Neuroendocrine tumors of the diffuse neuroendocrine system. *Curr Opin Oncol* 2008; 20(1):1-12.
6. Kidd M, Modlin IM, Bodei L, et al. Decoding the Molecular and Mutational Ambiguities of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasm Pathobiology. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2015; 1(2):131-153.
7. Modlin IM, Kidd M, Latich I, et al. Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology* 2005; 128(6):1717-51.
8. Sakuma Y SN, Lefor A. K. Pancreas Neuroendocrine Tumors: An Introduction. *JOP. J Pancreas (Online)* 2017; 18(S(3)):216-220.
9. Bhalla P, Powle V, Shah RC, et al. Neuroendocrine tumor of common hepatic duct. *Indian J Gastroenterol* 2012; 31(3):144-6.
10. Hallet J, Law CH, Cukier M, et al. Exploring the rising incidence of neuroendocrine tumors: a population-based analysis of epidemiology, metastatic presentation, and outcomes. *Cancer* 2015; 121(4):589-97.
11. Kaltsas GA, Besser GM, Grossman AB. The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors. *Endocr Rev* 2004; 25(3):458-511.
12. Rindi G, Villanacci V, Ubiali A. Biological and molecular aspects of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Digestion* 2000; 62 Suppl 1:19-26.
13. Bishop AE, Polak JM. Gastrointestinal endocrine tumours. Pathology. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1996; 10(4):555-69.
14. Ross MH, Pawlina W. Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology, 2016.
15. Basu B, Sirohi B, Corrie P. Systemic therapy for neuroendocrine tumours of gastroenteropancreatic origin. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17(1):R75-90.
16. Scalettar BA, Jacobs C, Fulwiler A, et al. Hindered submicron mobility and long-term storage of presynaptic dense-core granules revealed by single-particle tracking. *Dev Neurobiol* 2012; 72(9):1181-95.
17. Gann DS. Endocrine control of plasma protein and volume. *Surg Clin North Am* 1976; 56(5):1135-45.
18. Tischler AS, Dichter MA, Biales B, et al. Neural properties of cultured human endocrine tumor cells of proposed neural crest origin. *Science* 1976; 192(4242):902-4.
19. Andrew A, Kramer B, Rawdon BB. The origin of gut and pancreatic neuroendocrine (APUD) cells--the last word? *J Pathol* 1998; 186(2):117-8.
20. Waldum HL, Rorvik H, Falkmer S, et al. Neuroendocrine (ECL cell) differentiation of spontaneous gastric carcinomas of cotton rats (*Sigmodon hispidus*). *Lab Anim Sci* 1999; 49(3):241-7.
21. Wright NA. Letter from Waldum et al. commenting on the editorial by Andrew et al and responses. *J Pathol* 1999; 189(3):439-40.
22. Andrew A, Kramer B, Rawdon BB. The embryonic origin of endocrine cells of the gastrointestinal tract. *Gen Comp Endocrinol* 1982; 47(2):249-65.

23. Waldum HL, Sandvik AK, Angelsen A, et al. Re: Editorial entitled 'The origin of gut and pancreatic neuroendocrine (APUD) cells--the last word?'. *J Pathol* 1999; 188(1):113-4.
24. Kramer B, Andrew A. Further investigation into the source of pancreatic endocrine cell types. *Gen Comp Endocrinol* 1981; 44(3):279-87.
25. Andrew A. APUD cells and paraneurons: Embryonic origin. In: Fedoroff S, ed. *Advances in Cellular Neurobiology*, Vol. 2. New York: Academic Press; 1981:pp. 3-32.
26. Grande E, Capdevila J, Barriuso J, et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor cancer stem cells: do they exist? *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31(1-2):47-53.
27. Fontaine J, Le Lievre C, Le Douarin NM. What is the developmental fate of the neural crest cells which migrate into the pancreas in the avian embryo? *Gen Comp Endocrinol* 1977; 33(3):394-404.
28. Andrew A, Kramer B. An experimental investigation into the possible origin of pancreatic islet cells from rhombencephalic neuroectoderm. *J Embryol Exp Morphol* 1979; 52:23-38.
29. Fontaine-Perus J, Le Lievre C, Dubois MP. Do neural crest cells in the pancreas differentiate into somatostatin-containing cells? *Cell Tissue Res* 1980; 213(2):293-9.
30. Le Douarin NM, Teillet MA. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol* 1973; 30(1):31-48.
31. Fontaine J, Le Douarin NM. Analysis of endoderm formation in the avian blastoderm by the use of quail-chick chimaeras. The problem of the neuroectodermal origin of the cells of the APUD series. *J Embryol Exp Morphol* 1977; 41:209-22.
32. Pearse AG. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem* 1969; 17(5):303-13.
33. Pearse AG. The APUD cell concept and its implications in pathology. *Pathol Annu* 1974; 9(0):27-41.
34. Kloppel G, Heitz PU. Classification of normal and neoplastic neuroendocrine cells. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 733:19-23.
35. Pearse AG. The diffuse neuroendocrine system and the apud concept: related "endocrine" peptides in brain, intestine, pituitary, placenta, and anuran cutaneous glands. *Med Biol* 1977; 55(3):115-25.
36. Marrache F, Cazals-Hatem D, Kianmanesh R, et al. Endocrine tumor and intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: a fortuitous association? *Pancreas* 2005; 31(1):79-83.
37. Terada T, Ohta T, Kitamura Y, et al. Endocrine cells in intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. A histochemical and immunohistochemical study. *Virchows Arch* 1997; 431(1):31-6.
38. Goh BK, Ooi LL, Kumarasinghe MP, et al. Clinicopathological features of patients with concomitant intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas and pancreatic endocrine neoplasm. *Pancreatology* 2006; 6(6):520-6.
39. Paris M, Turrel-Cuzin C, Plachot C, et al. Review: pancreatic beta-cell neogenesis revisited. *Exp Diabetes Res* 2004; 5(2):111-21.
40. Laidlaw GF. Nesidioblastoma, the islet tumor of the pancreas. *Am J Pathol* 1938; 14(2):125-134 5.
41. Creutzfeldt W, Creutzfeldt C, Frerichs H, et al. Histochemistry, ultrastructure and hormone content of human insulinomas. *Horm Metab Res* 1976; Suppl 6:7-18.
42. Le Douarin NM. On the origin of pancreatic endocrine cells. *Cell* 1988; 53(2):169-71.
43. Rosai J. The origin of neuroendocrine tumors and the neural crest saga. *Mod Pathol* 2011; 24 Suppl 2:S53-7.
44. Kloppel G. Neuroendocrine Neoplasms: Dichotomy, Origin and Classifications. *Visc Med* 2017; 33(5):324-330.
45. Novelli MR, Williamson JA, Tomlinson IP, et al. Polyclonal origin of colonic adenomas in an XO/XY patient with FAP. *Science* 1996; 272(5265):1187-90.

46. Taylor RW, Barron MJ, Borthwick GM, et al. Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. *J Clin Invest* 2003; 112(9):1351-60.
47. Greaves LC, Preston SL, Tadrous PJ, et al. Mitochondrial DNA mutations are established in human colonic stem cells, and mutated clones expand by crypt fission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(3):714-9.
48. McDonald SA, Greaves LC, Gutierrez-Gonzalez L, et al. Mechanisms of field cancerization in the human stomach: the expansion and spread of mutated gastric stem cells. *Gastroenterology* 2008; 134(2):500-10.
49. Bouwens L, Kloppel G. Islet cell neogenesis in the pancreas. *Virchows Arch* 1996; 427(6):553-60.
50. Xia B, Zhan XR, Yi R, et al. Can pancreatic duct-derived progenitors be a source of islet regeneration? *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 383(4):383-5.
51. Zare M, Rastegar S, Ebrahimi E, et al. Role of pancreatic duct cell in beta cell neogenesis: A mini review study. *Diabetes Metab Syndr* 2017; 11 Suppl 1:S1-S4.
52. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* 1974; 141(4):537-61.
53. Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB. Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* 2004; 145(6):2639-44.
54. Schwitzgebel VM. Programming of the pancreas. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185(1-2):99-108.
55. Dumortier J, Ratineau C, Scoazec JY, et al. Site-specific epithelial-mesenchymal interactions in digestive neuroendocrine tumors. An experimental in vivo and in vitro study. *Am J Pathol* 2000; 156(2):671-83.
56. Barrett P, Hobbs RC, Coates PJ, et al. Endocrine cells of the human gastrointestinal tract have no proliferative capacity. *Histochem J* 1995; 27(6):482-6.
57. Karam S, Leblond CP. Origin and migratory pathways of the eleven epithelial cell types present in the body of the mouse stomach. *Microsc Res Tech* 1995; 31(3):193-214.
58. Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, et al. The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1014:1-12.
59. Kidd M, Modlin IM, Tang LH. Gastrin and the enterochromaffin-like cell: an acid update. *Dig Surg* 1998; 15(3):209-17.
60. Gammil SL, Weichert R. Common Origin for All Neuroendocrine Tumors. *Acta Radiologica: Therapy, Physics, Biology* 2009; 12(4):321-326.
61. Strobel O, Rosow DE, Rakhlin EY, et al. Pancreatic duct glands are distinct ductal compartments that react to chronic injury and mediate Shh-induced metaplasia. *Gastroenterology* 2010; 138(3):1166-77.
62. Vinik A CC, Perry RR, et al. . Diagnosis and Management of Pancreatic Neuroendocrine Tumors (PNETS) [Updated 2015 Nov 11]. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279074/>.
63. Strobel O, Rosow DE, Rakhlin EY, et al. Pancreatic Duct Glands Are Distinct Ductal Compartments That React to Chronic Injury and Mediate Shh-Induced Metaplasia. *Gastroenterology* 2010; 138(3):1166-1177.
64. Yamaguchi J, Liss AS, Sontheimer A, et al. Pancreatic duct glands (PDGs) are a progenitor compartment responsible for pancreatic ductal epithelial repair. *Stem Cell Research* 2015; 15(1):190-202.
65. Lumpkin EA, Collisson T, Parab P, et al. Math1-driven GFP expression in the developing nervous system of transgenic mice. *Gene Expr Patterns* 2003; 3(4):389-95.
66. Villaseñor A, Chong DC, Cleaver O. Biphasic Ngn3 expression in the developing pancreas. *Dev Dyn* 2008; 237(11):3270-9.

67. Klöppel G, Perren A, Heitz PU. The Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Cell System and Its Tumors: The WHO Classification. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004; 1014(1):13-27.
68. Kidd M, Hauso O, Drozdov I, et al. Delineation of the chemomechanosensory regulation of gastrin secretion using pure rodent G cells. *Gastroenterology* 2009; 137(1):231-41, 241 e1-10.
69. Gustafsson BI, Bakke I, Tommeras K, et al. A new method for visualization of gut mucosal cells, describing the enterochromaffin cell in the rat gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41(4):390-5.
70. Bohorquez DV, Liddle RA. Axon-like basal processes in enteroendocrine cells: characteristics and potential targets. *Clin Transl Sci* 2011; 4(5):387-91.
71. Kidd M, Gustafsson BI, Drozdov I, et al. IL1beta- and LPS-induced serotonin secretion is increased in EC cells derived from Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21(4):439-50.
72. Hauso O, Gustafsson BI, Waldum HL. Long slender cytoplasmic extensions: a common feature of neuroendocrine cells? *J Neuroendocrinol* 2007; 19(9):739-42.
73. Mace OJ, Tehan B, Marshall F. Pharmacology and physiology of gastrointestinal enteroendocrine cells. *Pharmacol Res Perspect* 2015; 3(4):e00155.
74. Öberg K. Chapter 151 - Carcinoid Syndrome. 2016.
75. Wiedenmann B, John M, Ahnert-Hilger G, et al. Molecular and cell biological aspects of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. *J Mol Med (Berl)* 1998; 76(9):637-47.
76. Singh S, Asa SL, Dey C, et al. Diagnosis and management of gastrointestinal neuroendocrine tumors: An evidence-based Canadian consensus. *Cancer Treat Rev* 2016; 47:32-45.
77. Bishop AE, Power RF, Polak JM. Markers for neuroendocrine differentiation. *Pathol Res Pract* 1988; 183(2):119-28.
78. Wiedenmann B, Huttner WB. Synaptophysin and chromogranins/secretogranins--widespread constituents of distinct types of neuroendocrine vesicles and new tools in tumor diagnosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1989; 58(2):95-121.
79. Lamberts SW, Hofland LJ, Nobels FR. Neuroendocrine tumor markers. *Front Neuroendocrinol* 2001; 22(4):309-39.
80. Papotti M, Bongiovanni M, Volante M, et al. Expression of somatostatin receptor types 1-5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Virchows Arch* 2002; 440(5):461-75.
81. Jakobsen AM, Andersson P, Saglik G, et al. Differential expression of vesicular monoamine transporter (VMAT) 1 and 2 in gastrointestinal endocrine tumours. *J Pathol* 2001; 195(4):463-72.
82. Feelders RA, Hofland LJ, Kwekkeboom DJ, et al. Neuroendocrine Tumors. In: Pfaff DW, Levine JE, eds. *Handbook of Neuroendocrinology*. San Diego: Academic Press; 2012:pp. 761-778.
83. Schimmack S, Lawrence B, Svejda B, et al. The clinical implications and biologic relevance of neurofilament expression in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Cancer* 2012; 118(10):2763-75.
84. Ardill JE, Eriksson B. The importance of the measurement of circulating markers in patients with neuroendocrine tumours of the pancreas and gut. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10(4):459-62.
85. Modlin IM, Gustafsson BI, Moss SF, et al. Chromogranin A--biological function and clinical utility in neuro endocrine tumor disease. *Ann Surg Oncol* 2010; 17(9):2427-43.

86. Kidd M, Modlin IM, Gustafsson BI, et al. Luminal regulation of normal and neoplastic human EC cell serotonin release is mediated by bile salts, amines, tastants, and olfactants. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295(2):G260-72.
87. Modlin IM, Oberg K, Chung DC, et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol* 2008; 9(1):61-72.
88. Portela-Gomes GM, Stridsberg M. Selective processing of chromogranin A in the different islet cells in human pancreas. *J Histochem Cytochem* 2001; 49(4):483-90.
89. Marotta V, Nuzzo V, Ferrara T, et al. Limitations of Chromogranin A in clinical practice. *Biomarkers* 2012; 17(2):186-91.
90. Kanakis G, Kaltsas G. Biochemical markers for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours (GEP-NETs). *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012; 26(6):791-802.
91. Lawrence B, Gustafsson BI, Kidd M, et al. The clinical relevance of chromogranin A as a biomarker for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2011; 40(1):111-34, viii.
92. Giovinazzo F, Schimmack S, Svejda B, et al. Chromogranin A and its fragments as regulators of small intestinal neuroendocrine neoplasm proliferation. *PLoS One* 2013; 8(11):e81111.
93. Ross MH. Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
94. Furness JB, Rivera LR, Cho HJ, et al. The gut as a sensory organ. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10(12):729-40.
95. Asa SL, Mete O. Endocrine pathology: past, present and future. *Pathology* 2018; 50(1):111-118.
96. Modlin IM, Gustafsson BI, Moss SF, et al. Chromogranin A—Biological Function and Clinical Utility in Neuro Endocrine Tumor Disease. *Annals of Surgical Oncology* 2010; 17(9):2427-2443.
97. Chalmers CJ, Gilley R, March HN, et al. The duration of ERK1/2 activity determines the activation of c-Fos and Fra-1 and the composition and quantitative transcriptional output of AP-1. *Cell Signal* 2007; 19(4):695-704.
98. Treinies I, Paterson HF, Hooper S, et al. Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal To stimulate DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 1999; 19(1):321-9.
99. Kinoshita Y, Nakata H, Kishi K, et al. Comparison of the signal transduction pathways activated by gastrin in enterochromaffin-like and parietal cells. *Gastroenterology* 1998; 115(1):93-100.
100. Abraham NS. Proton pump inhibitors: potential adverse effects. *Curr Opin Gastroenterol* 2012; 28(6):615-20.
101. Lawrence B, Kidd M, Svejda B, et al. A clinical perspective on gastric neuroendocrine neoplasia. *Curr Gastroenterol Rep* 2011; 13(1):101-9.
102. Berna MJ, Annibale B, Marignani M, et al. A prospective study of gastric carcinoids and enterochromaffin-like cell changes in multiple endocrine neoplasia type 1 and Zollinger-Ellison syndrome: identification of risk factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(5):1582-91.
103. Furukawa M, Raffeld M, Mateo C, et al. Increased expression of insulin-like growth factor I and/or its receptor in gastrinomas is associated with low curability, increased growth, and development of metastases. *Clin Cancer Res* 2005; 11(9):3233-42.
104. Kidd M, Modlin IM, Pfragner R, et al. Small bowel carcinoid (enterochromaffin cell) neoplasia exhibits transforming growth factor-beta1-mediated regulatory abnormalities including up-regulation of C-Myc and MTA1. *Cancer* 2007; 109(12):2420-31.
105. Papouchado B, Erickson LA, Rohlinger AL, et al. Epidermal growth factor receptor and activated epidermal growth factor receptor expression in gastrointestinal carcinoids and pancreatic endocrine carcinomas. *Mod Pathol* 2005; 18(10):1329-35.

106. Wulbrand U, Wied M, Zofel P, et al. Growth factor receptor expression in human gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Eur J Clin Invest* 1998; 28(12):1038-49.
107. Nilsson O, Wangberg B, Kolby L, et al. Expression of transforming growth factor alpha and its receptor in human neuroendocrine tumours. *Int J Cancer* 1995; 60(5):645-51.
108. Susini C, Buscail L. Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents. *Ann Oncol* 2006; 17(12):1733-42.
109. Wolin EM. The expanding role of somatostatin analogs in the management of neuroendocrine tumors. *Gastrointest Cancer Res* 2012; 5(5):161-8.
110. Caplin ME, Pavel M, Cwikla JB, et al. Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2014; 371(3):224-33.
111. Rinke A, Muller HH, Schade-Brittinger C, et al. Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group. *J Clin Oncol* 2009; 27(28):4656-63.
112. Li HJ, Kapoor A, Giel-Moloney M, et al. Notch signaling differentially regulates the cell fate of early endocrine precursor cells and their maturing descendants in the mouse pancreas and intestine. *Dev Biol* 2012; 371(2):156-69.
113. Nakakura EK, Sriuranpong VR, Kunnimalaiyaan M, et al. Regulation of neuroendocrine differentiation in gastrointestinal carcinoid tumor cells by notch signaling. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(7):4350-6.
114. Fendrich V, Waldmann J, Esni F, et al. Snail and Sonic Hedgehog activation in neuroendocrine tumors of the ileum. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14(3):865-74.
115. Shida T, Furuya M, Nikaido T, et al. Sonic hedgehog-Gli1 signaling pathway might become an effective therapeutic target in gastrointestinal neuroendocrine carcinomas. *Cancer Biology & Therapy* 2014; 5(11):1530-1538.
116. Di Florio A, Adesso L, Pedrotti S, et al. Src kinase activity coordinates cell adhesion and spreading with activation of mammalian target of rapamycin in pancreatic endocrine tumour cells. *Endocr Relat Cancer* 2011; 18(5):541-54.
117. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol* 2014; 4:64.
118. Silva JM, Bulman C, McMahon M. BRAFV600E cooperates with PI3K signaling, independent of AKT, to regulate melanoma cell proliferation. *Mol Cancer Res* 2014; 12(3):447-63.
119. Svejda B, Kidd M, Kazberouk A, et al. Limitations in small intestinal neuroendocrine tumor therapy by mTor kinase inhibition reflect growth factor-mediated PI3K feedback loop activation via ERK1/2 and AKT. *Cancer* 2011; 117(18):4141-54.
120. Rozengurt E, Soares HP, Sinnet-Smith J. Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple overactivation of compensatory pathways: an unintended consequence leading to drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(11):2477-88.
121. Tannapfel A, Vomschloss S, Karhoff D, et al. BRAF gene mutations are rare events in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Clin Pathol* 2005; 123(2):256-60.
122. Perren A, Schmid S, Locher T, et al. BRAF and endocrine tumors: mutations are frequent in papillary thyroid carcinomas, rare in endocrine tumors of the gastrointestinal tract and not detected in other endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11(4):855-60.
123. Karhoff D, Sauer S, Schrader J, et al. Rap1/B-Raf signaling is activated in neuroendocrine tumors of the digestive tract and Raf kinase inhibition constitutes a putative therapeutic target. *Neuroendocrinology* 2007; 85(1):45-53.
124. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(Database issue):D808-15.

125. Helpap B, Kollermann J. Immunohistochemical analysis of the proliferative activity of neuroendocrine tumors from various organs. Are there indications for a neuroendocrine tumor-carcinoma sequence? *Virchows Arch* 2001; 438(1):86-91.
126. Leotlela PD, Jauch A, Holtgreve-Grez H, et al. Genetics of neuroendocrine and carcinoid tumours. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10(4):437-50.
127. Hiripi E, Bermejo JL, Sundquist J, et al. Familial gastrointestinal carcinoid tumours and associated cancers. *Ann Oncol* 2009; 20(5):950-4.
128. Wale RJ, Williams JA, Beeley AH, et al. Familial occurrence in carcinoid tumours. *Aust N Z J Surg* 1983; 53(4):325-8.
129. Hemminki K, Li X. Familial carcinoid tumors and subsequent cancers: a nation-wide epidemiologic study from Sweden. *Int J Cancer* 2001; 94(3):444-8.
130. Hughes MS, Azoury SC, Assadipour Y, et al. Prospective evaluation and treatment of familial carcinoid small intestine neuroendocrine tumors (SI-NETs). *Surgery* 2016; 159(1):350-6.
131. Neklason DW, VanDerslice J, Curtin K, et al. Evidence for a heritable contribution to neuroendocrine tumors of the small intestine. *Endocr Relat Cancer* 2016; 23(2):93-100.
132. Arnason T, Sapp HL, Rayson D, et al. Loss of expression of DNA mismatch repair proteins is rare in pancreatic and small intestinal neuroendocrine tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135(12):1539-44.
133. Serracant Barrera A, Serra Pla S, Blazquez Mana CM, et al. Pancreatic non-functioning neuroendocrine tumor: a new entity genetically related to Lynch syndrome. *J Gastrointest Oncol* 2017; 8(5):E73-E79.
134. Metz DC, Jensen RT. Gastrointestinal neuroendocrine tumors: pancreatic endocrine tumors. *Gastroenterology* 2008; 135(5):1469-92.
135. Vortmeyer AO, Huang S, Lubensky I, et al. Non-islet origin of pancreatic islet cell tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(4):1934-8.
136. Wong WM, Wright NA. Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. *J Clin Pathol* 1999; 52(5):321-33.
137. Nordling CO. A new theory on cancer-inducing mechanism. *Br J Cancer* 1953; 7(1):68-72.
138. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68(4):820-3.
139. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10(8):789-99.
140. Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. *Nature* 2011; 476(7359):163-9.
141. Roche B, Sprouffske K, Hbid H, et al. Peto's paradox revisited: theoretical evolutionary dynamics of cancer in wild populations. *Evol Appl* 2013; 6(1):109-16.
142. Jiao Y, Shi C, Edil BH, et al. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* 2011; 331(6021):1199-203.
143. Oberg K, Eriksson B. Endocrine tumours of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19(5):753-81.
144. Chai SM, Brown IS, Kumarasinghe MP. Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: selected pathology review and molecular updates. *Histopathology* 2018; 72(1):153-167.
145. Zhang J, Francois R, Iyer R, et al. Current understanding of the molecular biology of pancreatic neuroendocrine tumors. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(14):1005-17.
146. Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuda A, et al. ras mutations in endocrine tumors: mutation detection by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83(10):1057-62.
147. Rindi G, Candusso ME, Solcia E. Molecular aspects of the endocrine tumours of the pancreas and the gastrointestinal tract. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31 Suppl 2:S135-8.

148. Corbo V, Dalai I, Scardoni M, et al. MEN1 in pancreatic endocrine tumors: analysis of gene and protein status in 169 sporadic neoplasms reveals alterations in the vast majority of cases. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17(3):771-83.
149. Larsson C, Skogseid B, Oberg K, et al. Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature* 1988; 332(6159):85-7.
150. Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24(3):355-70.
151. Boissan M, De Wever O, Lizarraga F, et al. Implication of metastasis suppressor NM23-H1 in maintaining adherens junctions and limiting the invasive potential of human cancer cells. *Cancer Res* 2010; 70(19):7710-22.
152. Wang Y, Ozawa A, Zaman S, et al. The tumor suppressor protein menin inhibits AKT activation by regulating its cellular localization. *Cancer Res* 2011; 71(2):371-82.
153. Jarhult J, Landerholm K, Falkmer S, et al. First Report on Metastasizing Small Bowel Carcinoids in First-Degree Relatives in Three Generations. *Neuroendocrinology* 2010; 91(4):318-323.
154. Marinoni I, Kurrer AS, Vassella E, et al. Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Gastroenterology* 2014; 146(2):453-60 e5.
155. Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science* 2011; 333(6041):425.
156. Singhi AD, Liu TC, Roncaioli JL, et al. Alternative Lengthening of Telomeres and Loss of DAXX/ATRX Expression Predicts Metastatic Disease and Poor Survival in Patients with Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Clin Cancer Res* 2017; 23(2):600-609.
157. Puto LA, Reed JC. Daxx represses RelB target promoters via DNA methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation. *Genes Dev* 2008; 22(8):998-1010.
158. Kasajima A, Pavel M, Darb-Esfahani S, et al. mTOR expression and activity patterns in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 2011; 18(1):181-92.
159. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(8):671-88.
160. Estrella JS, Broaddus RR, Mathews A, et al. Progesterone receptor and PTEN expression predict survival in patients with low- and intermediate-grade pancreatic neuroendocrine tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138(8):1027-36.
161. Scarpa A, Chang DK, Nones K, et al. Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature* 2017; 543(7643):65-71.
162. Martins D, Spada F, Lambrescu I, et al. Predictive Markers of Response to Everolimus and Sunitinib in Neuroendocrine Tumors. *Target Oncol* 2017; 12(5):611-622.
163. Yao JC, Pavel M, Phan AT, et al. Chromogranin A and neuron-specific enolase as prognostic markers in patients with advanced pNET treated with everolimus. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(12):3741-9.
164. Baudin E, Wolin E, Castellano D, et al. 6564 POSTER Correlation of PFS With Early Response of Chromogranin A and 5-hydroxyindoleacetic Acid Levels in Pts With Advanced Neuroendocrine Tumours: Phase III RADIANT-2 Study Results. *European Journal of Cancer* 2011; 47:S460.
165. Missiaglia E, Dalai I, Barbi S, et al. Pancreatic endocrine tumors: expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway. *J Clin Oncol* 2010; 28(2):245-55.
166. Russell RC, Fang C, Guan KL. An emerging role for TOR signaling in mammalian tissue and stem cell physiology. *Development* 2011; 138(16):3343-56.
167. Orlova KA, Crino PB. The tuberous sclerosis complex. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1184:87-105.
168. He Y, Sandoval J, Casaccia-Bonnel P. Events at the transition between cell cycle exit and oligodendrocyte progenitor differentiation: the role of HDAC and YY1. *Neuron Glia Biol* 2007; 3(3):221-31.

169. Cao Y, Gao Z, Li L, et al. Whole exome sequencing of insulinoma reveals recurrent T372R mutations in YY1. *Nat Commun* 2013; 4:2810.
170. Speel EJ, Richter J, Moch H, et al. Genetic differences in endocrine pancreatic tumor subtypes detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1999; 155(6):1787-94.
171. Speel EJ, Scheidweiler AF, Zhao J, et al. Genetic evidence for early divergence of small functioning and nonfunctioning endocrine pancreatic tumors: gain of 9Q34 is an early event in insulinomas. *Cancer Res* 2001; 61(13):5186-92.
172. Rigaud G, Missiaglia E, Moore PS, et al. High resolution allelotype of nonfunctional pancreatic endocrine tumors: identification of two molecular subgroups with clinical implications. *Cancer Res* 2001; 61(1):285-92.
173. Zhao J, Moch H, Scheidweiler AF, et al. Genomic imbalances in the progression of endocrine pancreatic tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 32(4):364-72.
174. Banck MS, Kanwar R, Kulkarni AA, et al. The genomic landscape of small intestine neuroendocrine tumors. *J Clin Invest* 2013; 123(6):2502-8.
175. Ghimenti C, Lonobile A, Campani D, et al. Microsatellite instability and allelic losses in neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. *Int J Oncol* 1999; 15(2):361-6.
176. Arnold CN, Sosnowski A, Blum HE. Analysis of molecular pathways in neuroendocrine cancers of the gastroenteropancreatic system. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1014:218-9.
177. Warth A, Kloor M, Schirmacher P, et al. Genetics and epigenetics of small bowel adenocarcinoma: the interactions of CIN, MSI, and CIMP. *Mod Pathol* 2011; 24(4):564-70.
178. Kidd M, Eick G, Shapiro MD, et al. Microsatellite instability and gene mutations in transforming growth factor-beta type II receptor are absent in small bowel carcinoid tumors. *Cancer* 2005; 103(2):229-36.
179. Planck M, Ericson K, Piotrowska Z, et al. Microsatellite instability and expression of MLH1 and MSH2 in carcinomas of the small intestine. *Cancer* 2003; 97(6):1551-7.
180. Muneyuki T, Watanabe M, Yamanaka M, et al. Combination analysis of genetic alterations and cell proliferation in small intestinal carcinomas. *Dig Dis Sci* 2000; 45(10):2022-8.
181. Kidd M, Modlin IM, Mane SM, et al. The role of genetic markers--NAP1L1, MAGE-D2, and MTA1--in defining small-intestinal carcinoid neoplasia. *Ann Surg Oncol* 2006; 13(2):253-62.
182. Francis JM, Kiezun A, Ramos AH, et al. Somatic mutation of CDKN1B in small intestine neuroendocrine tumors. *Nat Genet* 2013; 45(12):1483-6.
183. The Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487:330.
184. Kulke MH, Freed E, Chiang DY, et al. High-resolution analysis of genetic alterations in small bowel carcinoid tumors reveals areas of recurrent amplification and loss. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47(7):591-603.
185. Cunningham JL, Diaz de Stahl T, Sjoblom T, et al. Common pathogenetic mechanism involving human chromosome 18 in familial and sporadic ileal carcinoid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50(2):82-94.
186. Lollgen RM, Hessman O, Szabo E, et al. Chromosome 18 deletions are common events in classical midgut carcinoid tumors. *Int J Cancer* 2001; 92(6):812-5.
187. Du Y, Ter-Minassian M, Brais L, et al. Genetic associations with neuroendocrine tumor risk: results from a genome-wide association study. *Endocr Relat Cancer* 2016; 23(8):587-94.
188. Karpathakis A, Dibra H, Pipinikas C, et al. Prognostic Impact of Novel Molecular Subtypes of Small Intestinal Neuroendocrine Tumor. *Clin Cancer Res* 2016; 22(1):250-8.
189. Kytola S, Hoog A, Nord B, et al. Comparative genomic hybridization identifies loss of 18q22-qter as an early and specific event in tumorigenesis of midgut carcinoids. *Am J Pathol* 2001; 158(5):1803-8.

190. Kytola S, Nord B, Elder EE, et al. Alterations of the SDHD gene locus in midgut carcinoids, Merkel cell carcinomas, pheochromocytomas, and abdominal paragangliomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34(3):325-32.
191. Andersson E, Sward C, Stenman G, et al. High-resolution genomic profiling reveals gain of chromosome 14 as a predictor of poor outcome in ileal carcinoids. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16(3):953-66.
192. Petzmann S, Ullmann R, Halbwedl I, et al. Analysis of chromosome-11 aberrations in pulmonary and gastrointestinal carcinoids: an array comparative genomic hybridization-based study. *Virchows Arch* 2004; 445(2):151-9.
193. Lee M, Pellegata NS. Multiple endocrine neoplasia syndromes associated with mutation of p27. *J Endocrinol Invest* 2013; 36(9):781-7.
194. Karnik SK, Hughes CM, Gu X, et al. Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(41):14659-64.
195. Zikusoka MN, Kidd M, Eick G, et al. The molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer* 2005; 104(11):2292-309.
196. Calender A. Molecular genetics of neuroendocrine tumors. *Digestion* 2000; 62 Suppl 1(Suppl. 1):3-18.
197. Hassan MM, Phan A, Li D, et al. Family history of cancer and associated risk of developing neuroendocrine tumors: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(4):959-65.
198. Ilett EE, Langer SW, Olsen IH, et al. Neuroendocrine Carcinomas of the Gastroenteropancreatic System: A Comprehensive Review. *Diagnostics (Basel)* 2015; 5(2):119-76.
199. Yachida S, Vakiani E, White CM, et al. Small cell and large cell neuroendocrine carcinomas of the pancreas are genetically similar and distinct from well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Surg Pathol* 2012; 36(2):173-84.
200. Hijioka S, Hosoda W, Mizuno N, et al. Does the WHO 2010 classification of pancreatic neuroendocrine neoplasms accurately characterize pancreatic neuroendocrine carcinomas? *Journal of Gastroenterology* 2015; 50(5):564-572.
201. Tang LH, Basturk O, Sue JJ, et al. A Practical Approach to the Classification of WHO Grade 3 (G3) Well-differentiated Neuroendocrine Tumor (WD-NET) and Poorly Differentiated Neuroendocrine Carcinoma (PD-NEC) of the Pancreas. *Am J Surg Pathol* 2016; 40(9):1192-202.
202. Park C, Ha SY, Kim ST, et al. Identification of the BRAF V600E mutation in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Oncotarget* 2016; 7(4):4024-35.
203. Klempner SJ, Gershenhorn B, Tran P, et al. BRAFV600E Mutations in High-Grade Colorectal Neuroendocrine Tumors May Predict Responsiveness to BRAF-MEK Combination Therapy. *Cancer Discov* 2016; 6(6):594-600.
204. Eroglu Z, Ribas A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol* 2016; 8(1):48-56.
205. Olevian DC, Nikiforova MN, Chiosea S, et al. Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas frequently exhibit BRAF mutations and are associated with poor overall survival. *Hum Pathol* 2016; 49:124-34.
206. Jesinghaus M, Konukiewitz B, Keller G, et al. Colorectal mixed adenoneuroendocrine carcinomas and neuroendocrine carcinomas are genetically closely related to colorectal adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2017; 30(4):610-619.
207. Takizawa N, Ohishi Y, Hirahashi M, et al. Molecular characteristics of colorectal neuroendocrine carcinoma; similarities with adenocarcinoma rather than neuroendocrine tumor. *Hum Pathol* 2015; 46(12):1890-900.

208. Tang LH, Untch BR, Reidy DL, et al. Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors with a Morphologically Apparent High-Grade Component: A Pathway Distinct from Poorly Differentiated Neuroendocrine Carcinomas. *Clin Cancer Res* 2016; 22(4):1011-7.
209. Woischke C, Schaaf CW, Yang HM, et al. In-depth mutational analyses of colorectal neuroendocrine carcinomas with adenoma or adenocarcinoma components. *Mod Pathol* 2017; 30(1):95-103.
210. Sahnane N, Furlan D, Monti M, et al. Microsatellite unstable gastrointestinal neuroendocrine carcinomas: a new clinicopathologic entity. *Endocr Relat Cancer* 2015; 22(1):35-45.
211. Nishikura K, Watanabe H, Iwafuchi M, et al. Carcinogenesis of gastric endocrine cell carcinoma: analysis of histopathology and p53 gene alteration. *Gastric Cancer* 2003; 6(4):203-9.
212. Lawrence B, Gustafsson BI, Chan A, et al. The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2011; 40(1):1-18, vii.
213. Lee J, Sung CO, Lee EJ, et al. Metastasis of neuroendocrine tumors are characterized by increased cell proliferation and reduced expression of the ATM gene. *PLoS One* 2012; 7(4):e34456.
214. Shin JU, Lee CH, Lee KT, et al. Prognostic significance of ATM and cyclin B1 in pancreatic neuroendocrine tumor. *Tumour Biol* 2012; 33(5):1645-51.
215. Sun M, Guo X, Qian X, et al. Activation of the ATM-Snail pathway promotes breast cancer metastasis. *J Mol Cell Biol* 2012; 4(5):304-15.
216. Li DQ, Pakala SB, Nair SS, et al. Metastasis-associated protein 1/nucleosome remodeling and histone deacetylase complex in cancer. *Cancer Res* 2012; 72(2):387-94.
217. Azzoni C, Bottarelli L, Cecchini S, et al. Involvement of HER-2/neu and metastasis-related proteins in the development of ileal neuroendocrine tumors. *Virchows Arch* 2011; 458(5):525-36.
218. Drozdov I, Kidd M, Nadler B, et al. Predicting neuroendocrine tumor (carcinoid) neoplasia using gene expression profiling and supervised machine learning. *Cancer* 2009; 115(8):1638-50.
219. Bloomston M, Durkin A, Yang I, et al. Identification of molecular markers specific for pancreatic neuroendocrine tumors by genetic profiling of core biopsies. *Ann Surg Oncol* 2004; 11(4):413-9.
220. Oberg K. The genetics of neuroendocrine tumors. *Semin Oncol* 2013; 40(1):37-44.
221. Williams GT. Endocrine tumours of the gastrointestinal tract-selected topics. *Histopathology* 2007; 50(1):30-41.
222. Finnerty BM, Gray KD, Moore MD, et al. Epigenetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: A clinicopathologic perspective. *World J Gastrointest Oncol* 2017; 9(9):341-353.
223. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science* 1987; 238(4824):163-70.
224. Yao JC, Shah MH, Ito T, et al. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011; 364(6):514-23.
225. Hoareau-Aveilla C, Meggetto F. Crosstalk between microRNA and DNA Methylation Offers Potential Biomarkers and Targeted Therapies in ALK-Positive Lymphomas. *Cancers (Basel)* 2017; 9(8):100.
226. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349(21):2042-54.
227. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358(11):1148-59.
228. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 2012; 150(1):12-27.
229. Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, et al. The eukaryotic genome as an RNA machine. *Science* 2008; 319(5871):1787-9.

230. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell* 2011; 43(6):904-14.
231. Yarmishyn AA, Kurochkin IV. Long noncoding RNAs: a potential novel class of cancer biomarkers. *Front Genet* 2015; 6:145.
232. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009; 4:199-227.
233. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 2002; 20(10):2429-40.
234. Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 2006; 106(8):1794-803.
235. Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, et al. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist* 2007; 12(10):1247-52.
236. Piekarz RL, Frye R, Turner M, et al. Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009; 27(32):5410-7.
237. Ling H, Fabbri M, Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12(11):847-65.
238. Wang DS, Zhang DS, Qiu MZ, et al. Prognostic factors and survival in patients with neuroendocrine tumors of the pancreas. *Tumour Biol* 2011; 32(4):697-705.
239. Kim H, Lee JE, Cho EJ, et al. Menin, a tumor suppressor, represses JunD-mediated transcriptional activity by association with an mSin3A-histone deacetylase complex. *Cancer Res* 2003; 63(19):6135-9.
240. Yang YJ, Song TY, Park J, et al. Menin mediates epigenetic regulation via histone H3 lysine 9 methylation. *Cell Death Dis* 2013; 4(4):e583.
241. Gurung B, Feng Z, Iwamoto DV, et al. Menin epigenetically represses Hedgehog signaling in MEN1 tumor syndrome. *Cancer Res* 2013; 73(8):2650-8.
242. Lin W, Watanabe H, Peng S, et al. Dynamic epigenetic regulation by menin during pancreatic islet tumor formation. *Mol Cancer Res* 2015; 13(4):689-98.
243. Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, et al. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 2008; 132(3):363-74.
244. Francis J, Lin W, Rozenblatt-Rosen O, et al. The menin tumor suppressor protein is phosphorylated in response to DNA damage. *PLoS One* 2011; 6(1):e16119.
245. Fang M, Xia F, Mahalingam M, et al. MEN1 is a melanoma tumor suppressor that preserves genomic integrity by stimulating transcription of genes that promote homologous recombination-directed DNA repair. *Mol Cell Biol* 2013; 33(13):2635-47.
246. Dalgliesh GL, Furge K, Greenman C, et al. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature* 2010; 463(7279):360-3.
247. Robinson CM, Ohh M. The multifaceted von Hippel-Lindau tumour suppressor protein. *FEBS Lett* 2014; 588(16):2704-11.
248. de Wilde RF, Heaphy CM, Maitra A, et al. Loss of ATRX or DAXX expression and concomitant acquisition of the alternative lengthening of telomeres phenotype are late events in a small subset of MEN-1 syndrome pancreatic neuroendocrine tumors. *Mod Pathol* 2012; 25(7):1033-9.
249. Pipinikas CP, Dibra H, Karpathakis A, et al. Epigenetic dysregulation and poorer prognosis in DAXX-deficient pancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 2015; 22(3):L13-8.
250. Zlatanova J, Seebart C, Tomschik M. Nap1: taking a closer look at a juggler protein of extraordinary skills. *FASEB J* 2007; 21(7):1294-310.
251. Park YJ, Chodaparambil JV, Bao Y, et al. Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J Biol Chem* 2005; 280(3):1817-25.

252. Schimmack S, Taylor A, Lawrence B, et al. A mechanistic role for the chromatin modulator, NAP1L1, in pancreatic neuroendocrine neoplasm proliferation and metastases. *Epigenetics Chromatin* 2014; 7:15.
253. Attia M, Rachez C, De Pauw A, et al. Nap1l2 promotes histone acetylation activity during neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* 2007; 27(17):6093-102.
254. Zhang HY, Rumilla KM, Jin L, et al. Association of DNA methylation and epigenetic inactivation of RASSF1A and beta-catenin with metastasis in small bowel carcinoid tumors. *Endocrine* 2006; 30(3):299-306.
255. Ruebel K, Leontovich AA, Stilling GA, et al. MicroRNA expression in ileal carcinoid tumors: downregulation of microRNA-133a with tumor progression. *Mod Pathol* 2010; 23(3):367-75.
256. Li SC, Essaghir A, Martijn C, et al. Global microRNA profiling of well-differentiated small intestinal neuroendocrine tumors. *Mod Pathol* 2013; 26(5):685-96.
257. How-Kit A, Dejeux E, Dousset B, et al. DNA methylation profiles distinguish different subtypes of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Epigenomics* 2015; 7(8):1245-58.
258. Andersson E, Arvidsson Y, Sward C, et al. Expression profiling of small intestinal neuroendocrine tumors identifies subgroups with clinical relevance, prognostic markers and therapeutic targets. *Mod Pathol* 2016; 29(6):616-29.
259. Halasi M, Gartel AL. FOX(M1) news--it is cancer. *Mol Cancer Ther* 2013; 12(3):245-54.
260. Zona S, Bella L, Burton MJ, et al. FOXM1: an emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1839(11):1316-22.
261. Massague J. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(10):616-30.
262. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008; 134(2):215-30.
263. Jiang J, Dingleline R. Role of prostaglandin receptor EP2 in the regulations of cancer cell proliferation, invasion, and inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; 344(2):360-7.
264. Hamidi T, Cano CE, Grasso D, et al. Nupr1-aurora kinase A pathway provides protection against metabolic stress-mediated autophagic-associated cell death. *Clin Cancer Res* 2012; 18(19):5234-46.
265. Arvidsson Y, Johanson V, Pfragner R, et al. Cytotoxic Effects of Valproic Acid on Neuroendocrine Tumour Cells. *Neuroendocrinology* 2016; 103(5):578-91.
266. Mohammed TA, Holen KD, Jaskula-Sztul R, et al. A pilot phase II study of valproic acid for treatment of low-grade neuroendocrine carcinoma. *Oncologist* 2011; 16(6):835-43.
267. Perri F, Longo F, Giuliano M, et al. Epigenetic control of gene expression: Potential implications for cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017; 111:166-172.
268. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol* 2006; 24(29):4677-84.
269. Thorns C, Schurmann C, Gebauer N, et al. Global microRNA profiling of pancreatic neuroendocrine neoplasias. *Anticancer Res* 2014; 34(5):2249-54.
270. Miller HC, Frampton AE, Malczewska A, et al. MicroRNAs associated with small bowel neuroendocrine tumours and their metastases. *Endocr Relat Cancer* 2016; 23(9):711-26.
271. Li SC, Shi H, Khan M, et al. Roles of miR-196a on gene regulation of neuroendocrine tumor cells. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 412:131-9.
272. Lee YS, Kim H, Kim HW, et al. High Expression of MicroRNA-196a Indicates Poor Prognosis in Resected Pancreatic Neuroendocrine Tumor. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(50):e2224.
273. Jiang X, Shan A, Su Y, et al. miR-144/451 Promote Cell Proliferation via Targeting PTEN/AKT Pathway in Insulinomas. *Endocrinology* 2015; 156(7):2429-39.
274. Li SC, Khan M, Caplin M, et al. Somatostatin Analogs Treated Small Intestinal Neuroendocrine Tumor Patients Circulating MicroRNAs. *PLoS One* 2015; 10(5):e0125553.
275. Modali SD, Parekh VI, Kebebew E, et al. Epigenetic regulation of the lncRNA MEG3 and its target c-MET in pancreatic neuroendocrine tumors. *Mol Endocrinol* 2015; 29(2):224-37.

276. Bodei L, Sundin A, Kidd M, et al. The status of neuroendocrine tumor imaging: from darkness to light? *Neuroendocrinology* 2015; 101(1):1-17.
277. Baum RP, Kulkarni HR, Carreras C. Peptides and receptors in image-guided therapy: theranostics for neuroendocrine neoplasms. *Semin Nucl Med* 2012; 42(3):190-207.
278. Koopmans KP, de Vries EG, Kema IP, et al. Staging of carcinoid tumours with 18F-DOPA PET: a prospective, diagnostic accuracy study. *Lancet Oncol* 2006; 7(9):728-34.
279. Orlefors H, Sundin A, Garske U, et al. Whole-body (11)C-5-hydroxytryptophan positron emission tomography as a universal imaging technique for neuroendocrine tumors: comparison with somatostatin receptor scintigraphy and computed tomography. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(6):3392-400.
280. Binderup T, Knigge U, Loft A, et al. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts survival of patients with neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2010; 16(3):978-85.
281. Grozinsky-Glasberg S, Pavel M. Inhibition of mTOR in carcinoid tumors. *Target Oncol* 2012; 7(3):189-95.
282. McCarthy N. Anticancer drugs: Targeting menin. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11(3):190.
283. Shi A, Murai MJ, He S, et al. Structural insights into inhibition of the bivalent menin-MLL interaction by small molecules in leukemia. *Blood* 2012; 120(23):4461-9.
284. Cierpicki T, Grembecka J. Challenges and opportunities in targeting the menin-MLL interaction. *Future Med Chem* 2014; 6(4):447-62.
285. Mohammad KS, Javelaud D, Fournier PG, et al. TGF-beta-RI kinase inhibitor SD-208 reduces the development and progression of melanoma bone metastases. *Cancer Res* 2011; 71(1):175-84.
286. Della Gatta G, Palomero T, Perez-Garcia A, et al. Reverse engineering of TLX oncogenic transcriptional networks identifies RUNX1 as tumor suppressor in T-ALL. *Nat Med* 2012; 18(3):436-40.
287. Piccaluga PP, De Falco G, Kustagi M, et al. Gene expression analysis uncovers similarity and differences among Burkitt lymphoma subtypes. *Blood* 2011; 117(13):3596-608.
288. Modlin IM, Gustafsson BI, Drozdov I, et al. Principal component analysis, hierarchical clustering, and decision tree assessment of plasma mRNA and hormone levels as an early detection strategy for small intestinal neuroendocrine (carcinoid) tumors. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(2):487-98.
289. Kidd MS, Alaimo D, Callahan S, et al. A multi-transcript blood signature for detection and assessment of gut neuroendocrine tumors. *Journal of Clinical Oncology* 2014; 32(3):216-216.
290. Modlin IM, Drozdov I, Bodei L, et al. Blood transcript analysis and metastatic recurrent small bowel carcinoid management. *BMC Cancer* 2014; 14(1):564.
291. Modlin IM, Drozdov I, Alaimo D, et al. A multianalyte PCR blood test outperforms single analyte ELISAs (chromogranin A, pancreastatin, neurokinin A) for neuroendocrine tumor detection. *Endocr Relat Cancer* 2014; 21(4):615-28.
292. Modlin IM, Drozdov I, Kidd M. The identification of gut neuroendocrine tumor disease by multiple synchronous transcript analysis in blood. *PLoS One* 2013; 8(5):e63364.
293. Modlin IM, Drozdov I, Kidd M. Gut neuroendocrine tumor blood qPCR fingerprint assay: characteristics and reproducibility. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52(3):419-29.
294. Modlin IM, Aslanian H, Bodei L, et al. A PCR blood test outperforms chromogranin A in carcinoid detection and is unaffected by proton pump inhibitors. *Endocr Connect* 2014; 3(4):215-23.
295. Modlin IM, Aslanian H, Bodei L, et al. A PCR blood test outperforms chromogranin A in carcinoid detection and is unaffected by proton pump inhibitors. *Endocrine Connections* 2014; 3(4):215-223.

296. Modlin IM, Kidd M, Bodei L, et al. The clinical utility of a novel blood-based multi-transcriptome assay for the diagnosis of neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol* 2015; 110(8):1223-32.
297. Cwikla JB, Bodei L, Kolasinska-Cwikla A, et al. Circulating Transcript Analysis (NETest) in GEP-NETs Treated With Somatostatin Analogs Defines Therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100(11):E1437-45.
298. Pavel M, Jann H, Prasad V, et al. NET Blood Transcript Analysis Defines the Crossing of the Clinical Rubicon: When Stable Disease Becomes Progressive. *Neuroendocrinology* 2017; 104(2):170-182.
299. Bodei L, Kidd M, Modlin IM, et al. Gene transcript analysis blood values correlate with (6)(8)Ga-DOTA-somatostatin analog (SSA) PET/CT imaging in neuroendocrine tumors and can define disease status. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015; 42(9):1341-52.
300. Crabtree JS. Clinical and Preclinical Advances in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumor Therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017; 8:341.
301. Alexander VM, Roy M, Steffens KA, et al. Azacytidine induces cell cycle arrest and suppression of neuroendocrine markers in carcinoids. *Int J Clin Exp Med* 2010; 3(2):95-102.
302. Baradari V, Huether A, Hopfner M, et al. Antiproliferative and proapoptotic effects of histone deacetylase inhibitors on gastrointestinal neuroendocrine tumor cells. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13(4):1237-50.
303. Adler JT, Hottinger DG, Kunnimalaiyaan M, et al. Combination therapy with histone deacetylase inhibitors and lithium chloride: a novel treatment for carcinoid tumors. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(2):481-6.
304. Shah MH, Binkley P, Chan K, et al. Cardiotoxicity of histone deacetylase inhibitor depsipeptide in patients with metastatic neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12(13):3997-4003.
305. Carter CA, Degesys A, Oronsky B, et al. Flushing Out Carcinoid Syndrome: Beneficial Effect of the Anticancer Epigenetic Agent RRx-001 in a Patient with a Treatment-Refractory Neuroendocrine Tumor. *Case Rep Oncol* 2015; 8(3):461-5.
306. Yao JC, Lagunes DR, Kulke MH. Targeted therapies in neuroendocrine tumors (NET): clinical trial challenges and lessons learned. *Oncologist* 2013; 18(5):525-32.
307. Champaneria MC, Modlin IM, Kidd M, et al. Friedrich Feyrter: a precise intellect in a diffuse system. *Neuroendocrinology* 2006; 83(5-6):394-404.
308. Agarwal SK. The future: genetics advances in MEN1 therapeutic approaches and management strategies. *Endocr Relat Cancer* 2017; 24(10):T119-T134.
309. Li JWY, Hua X, Reidy-Lagunes D, et al. MENIN loss as a tissue-specific driver of tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2017.
310. Marini F, Giusti F, Tonelli F, et al. Management impact: effects on quality of life and prognosis in MEN1. *Endocr Relat Cancer* 2017; 24(10):T227-T242.
311. Dreijerink KMA, Timmers HTM, Brown M. Twenty years of menin: emerging opportunities for restoration of transcriptional regulation in MEN1. *Endocr Relat Cancer* 2017; 24(10):T135-T145.
312. Feng Z, Ma J, Hua X. Epigenetic regulation by the menin pathway. *Endocr Relat Cancer* 2017; 24(10):T147-T159.
313. Aristizabal Prada ET, Auernhammer CJ. Targeted therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: preclinical strategies and future targets. *Endocr Connect* 2018; 7(1):R1-R25.
314. Solcia E, Fiocca R, Rindi G, et al. The pathology of the gastrointestinal endocrine system. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1993; 22(4):795-821.
315. Qvigstad G, Qvigstad T, Westre B, et al. Neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinomas associated with severe hypergastrinemia and/or pernicious anemia. *APMIS* 2002; 110(2):132-9.

316. Latif F, Tory K, Gnarr J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993; 260(5112):1317-20.
317. Solcia E, Vanoli A. Histogenesis and natural history of gut neuroendocrine tumors: present status. *Endocr Pathol* 2014; 25(2):165-70.
318. Pearse AG. The calcitonin secreting C cells and their relationship to the APUD cell series. *J.Endocrinol.* 1969; 45(1):Suppl-4.
319. Chamberlain RS, Blumgart LH. Carcinoid tumors of the extrahepatic bile duct. A rare cause of malignant biliary obstruction. *Cancer* 1999; 86(10):1959-65.
320. Eltawil KM, Gustafsson BI, Kidd M, et al. Neuroendocrine tumors of the gallbladder: an evaluation and reassessment of management strategy. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44(10):687-95.
321. Lloyd R. Practical markers used in the diagnosis of neuroendocrine tumors. *Endocrine Pathology* 2003; 14(4):293-301.
322. Kloppel G, Rindi G, Anlauf M, et al. Site-specific biology and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Virchows Arch* 2007; 451 Suppl 1:S9-27.
323. Kloppel G. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: towards a standardized approach to the diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and their prognostic stratification. *Neuroendocrinology* 2009; 90:162-166.
324. Langley K. The neuroendocrine concept today. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 733:1-17.
325. Brittan M, Wright NA. Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development. *Gut* 2004; 53(6):899-910.
326. Rindi G, Villanacci V, Ubiali A, et al. Endocrine tumors of the digestive tract and pancreas: histogenesis, diagnosis and molecular basis. *Expert Rev Mol Diagn* 2001; 1(3):323-33.
327. Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, et al. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas* 2010; 39(6):707-12.
328. Maton PN, Gardner JD, Jensen RT. Cushing's syndrome in patients with the Zollinger-Ellison syndrome. *N Engl J Med* 1986; 315(1):1-5.
329. Rehfeld JF. Beginnings: a reflection on the history of gastrointestinal endocrinology. *Regul Pept* 2012; 177 Suppl:S1-5.
330. Rehfeld JF. The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiol Rev* 1998; 78(4):1087-108.
331. Heitz PU, Kloppel G, Hacki WH, et al. Nesidioblastosis: the pathologic basis of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia in infants. Morphologic and quantitative analysis of seven cases based on specific immunostaining and electron microscopy. *Diabetes* 1977; 26(7):632-42.
332. Maier W, Schumacher KA, Etzrodt H, et al. An neurotensinoma of the head of the pancreas. Demonstration by ultrasound and computed tomography. *Eur J Radiol* 1982; 2(2):125-7.
333. Eriksson B, Oberg K. Neuroendocrine tumours of the pancreas. *Br J Surg* 2000; 87(2):129-31.
334. Vinik AI, Strodel WE, Eckhauser FE, et al. Somatostatinomas, PPomas, neurotensinomas. *Semin Oncol* 1987; 14(3):263-81.
335. O'Dorisio TM. Pancreatic polypeptide and mixed polypeptide producing tumors of the gastrointestinal tract. In Cohen S, Sobway RD (eds): Hormone-Producing Tumors of the Gastrointestinal Tract. New York, Churchill Livingstone, 1985, p 117. In AL: V, ed., 1985.
336. Wilander E, Lundqvist M, Oberg K. Gastrointestinal carcinoid tumours. Histogenetic, histochemical, immunohistochemical, clinical and therapeutic aspects. *Prog Histochem Cytochem* 1989; 19(2):1-88.
337. Kloppel G, Heitz PU, Capella C, et al. Pathology and nomenclature of human gastrointestinal neuroendocrine (carcinoid) tumors and related lesions. *World J Surg* 1996; 20(2):132-41.
338. Chetty R. An overview of practical issues in the diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132(8):1285-9.

339. Bosman F. CF, Hruban R., et al.,. WHO Classification of Tumors of the Digestive System , IARC Press, Lyon, France, 2010. 2010.
340. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al. Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. *J Thorac Oncol* 2015; 10(9):1240-1242.
341. Marx A, Chan JK, Coindre JM, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Thymus: Continuity and Changes. *J Thorac Oncol* 2015; 10(10):1383-95.
342. DeLellis RA. World Health Organization classification of tumours. Pathology & Genetics of Tumours of Endocrine Organs. Lyon, France: IARC Press. *In* Lloyd RV HPU, et al., eds., 2004.
343. Barnes L. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of head and neck.. World Health Organization classification of tumours. Lyon: IARC Press; 2005. *In* Eveson JW RP, Sidransky D., ed., 2005.
344. Kurman RJ. Pathology and genetics of tumours of female reproductive organs. World Health Organization classification of tumours. Lyon: IARC Press; 2014. *In* Carcangiu ML HC, Young RH, ed., 2014.
345. Lakhani SR. Pathology and genetics of tumours of the breast. World Health Organization Classification of tumours. Lyon: IARC Press; 2012. *In* Ellis IO SS, Tan PH, van de Vijver MJ., ed., 2012.
346. Moch H. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. World Health Organization classification of tumours. Lyon: IARC Press;. *In* Humphrey PA UT, Reuter VE., ed., 2016.
347. LeBoit PE. Pathology and genetics of skin tumours. World Health Organization classification of tumours. Lyon: IARC Press;. *In* Burg G WD, Sarasain A., ed., 2006.
348. Pacak K, Taïeb D. Diagnostic and therapeutic nuclear medicine for neuroendocrine tumors, 2017.
349. Kizilgul M, Delibasi T. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs). *Translational Gastrointestinal Cancer* 2014; 4(1):39-56.
350. Nasir A, Coppola D. Neuroendocrine Tumors: Review of Pathology, Molecular and Therapeutic Advances. 2016.
351. Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 2003; 97(4):934-59.
352. Bertino EM, Confer PD, Colonna JE, et al. Pulmonary neuroendocrine/carcinoid tumors: a review article. *Cancer* 2009; 115(19):4434-41.